

Die Kontraktilität der Follikelmembran
des Rindes in Abhängigkeit vom Reifegrad
des Graaf'schen Follikels

von

Hans Christian Dahlen

aus

Neviges

*Diss. Erlangen
1901*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Frauenklinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen - Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. K. G. Ober)

**Die Kontraktilität der Follikelmembran
des Rindes in Abhängigkeit vom Reifegrad
des Graaf'schen Follikels**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von

Hans Christian Dahlen

aus
Neviges

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr. H. Becker

Korreferent: Prof. Dr. K.G. Ober

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1981

Meinen Eltern
und meiner Frau Hisako
in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINFÜHRUNG	1
II. VERSUCHSPLANUNG UND METHODE	8
1. Überlegungen zur Untersuchungsmethode	8
1.1. Die kontraktile Elemente in der Follikelmembran	8
1.2. Die physikalischen Eigenschaften der Follikelmembran	11
1.3. Überlegungen zur Meßmethode	14
1.4. Der Begriff der Wandspannung	15
1.5. Die Eigenschaften von Histamin	17
2. Untersuchungsmaterial	19
3. Versuchsaufbau	19
3.1. Die Versuchsanordnung	19
3.2. Hilfsmittel	21
4. Untersuchungsablauf	24
5. Die Anfertigung der histologischen Präparate	26
5.1. Präparate für das Lichtmikroskop	26
5.2. Präparate für das Elektronenmikroskop	27

	Seite
III. ERGEBNISSE	28
1. Ergebnisse der Voruntersuchungen	28
1.1. Bestimmung einer geeigneten Histamintestdosis	28
1.2. Bestimmung einer geeigneten Vorlast	33
2. Ergebnisse des Hauptversuchs	38
2.1. Die histologische Beurteilung der Entwicklungsstadien im Lichtmikroskop	38
2.1.1. Allgemeine Entwicklung und Struk- tur der Follikelhaut	38
2.1.2. Präovulatorische und ovulato- rische Veränderungen	40
2.1.3. Atresie	41
2.1.4. Die Klassifizierung der Ent- wicklungsstadien	42
2.2. Die Abhängigkeit der Kontraktions- kraft vom Volumen und Entwicklungs- stadium des Follikels	52
2.3. Statistische Auswertung der Unter- suchungsergebnisse	57
2.4. Ergebnisse aus der elektronenmi- kroskopischen Untersuchung der Follikelhautstreifen	60

	Seite
IV. DISKUSSION	70
1. Zusammenfassung der Ergebnisse	70
2. Wertung der Ergebnisse	73
V. LITERATURVERZEICHNIS	81

EINFÜHRUNG

Warum kommt es zur Ovulation? Welche Faktoren und Vorgänge induzieren sie? Welche Veränderungen des Graaf'schen Follikels und welche Einwirkungen auf ihn lassen zum Zeitpunkt der Ovulation die Follikelwand einreißen und ermöglichen die Ausschwemmung des Eies in die Tube? Zahlreiche biochemische, biophysikalische und histologische Untersuchungen, in vivo- und in vitro-Versuche sind durchgeführt worden, um den Mechanismus der Ovulation verstehen zu lernen.

Die Follikelhaut unterliegt als Begrenzung eines vollständig mit Flüssigkeit gefüllten Hohlraumes mit einem Innendruck einer Wandspannung. Die Ovulation tritt in dem Moment ein, in dem die Wandspannung an einer Stelle der Follikeloberfläche die Haltbarkeit des dortigen Gewebes übersteigt, sodaß es zum Einriß der Follikelhaut kommt. Die Ursache für die Ovulation mag daher einmal in einer Erhöhung der Wandspannung durch Zunahme des Follikelvolumens oder in der Steigerung des Innendrucks liegen, andererseits in der Abnahme der Wandstärke oder in qualitativen Veränderungen der Follikelmembran, die deren Haltbarkeit entscheidend herabsetzen.

Als naheliegende Ursache, und lange Zeit nicht überprüft, vermutete man einen schnellen Anstieg des intrafollikulären Drucks mit einer Überdehnung der Follikelmembran, die dem Druckanstieg nicht mehr folgen konnte und dann einriß (5,64,65, 68,70). Man nahm für die Druckerhöhung eine

Volumenzunahme der Follikelflüssigkeit an, durch eine Erhöhung des Blutdrucks oder der ovariellen Durchblutung (6,44), auf Grund einer venösen Abflußstauung (10,29,42), durch eine Steigerung der kapillaren Permeabilität und Transsudation von Flüssigkeit aus der Theka interna in das Antrum folliculi (10,68), oder bedingt durch eine schnelle Depolymerisation von Mucopolysacchariden, vermittelt durch Enzyme in der Follikelflüssigkeit (1,35,56,81,82).

Mit Druckmessungen in vivo durch Implantation eines Druckaufnehmers im Ovar beim Kaninchen (74) und mit Mikropipetten direkt im Follikel von Ratte und Kaninchen (4,16,17,40) konnte aber nachgewiesen werden, daß der intrafollikuläre Druck während des Follikelwachstums und zum Zeitpunkt der Ovulation hin nicht ansteigt. Beim Kaninchen wurde bei prä- und postcoitalen Follikeln ein durchschnittlicher Druck von 17 mmHg gemessen, der kurz vor der Ovulation sogar auf 5 mmHg abfiel (4).

Weiterhin besteht zwischen dem intrafollikulären Druck und dem Blutdruck eine direkte Abhängigkeit (16). Die Blut-Liquor folliculi-Schranke scheint für kleinmolekulare Substanzen und Wassermoleküle hoch permeabel zu sein (55). Bei einer kurzfristigen künstlichen Erhöhung des Follikelinnendrucks nimmt dieser wieder nach kurzer Zeit über diesen Ausgleichsweg den Ausgangswert an. Auch zeigte sich in Vergleichen zwischen der Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit und der des Plasmas keine wesentlichen Unterschiede (41).

Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Ovulationsauslösung durch einen intrafollikulären Druckanstieg. Sie nehmen die Follikelhöhle als ein mit dem Blutkreislauf in Verbindung stehendes extravasales Kompartiment an.

Durch Einwirkung oder Vermittlung des luteinisierenden Hormons tritt ungefähr 8-10 Stunden vor dem Ovulationszeitpunkt eine histologisch sichtbare Umwandlung der Follikelmembran ein, die alle Schichten, die Granulosa, die Basalmembran, die Theka interna und externa, die Tunica albuginea als auch das Keimepithel betrifft (32).

Die Tunica albuginea ist die mechanisch stärkste Barriere, die das Ei von der Außenwelt trennt (24). Ihre früher oftmals schwierig nachweisbaren (54), heute mit verbesserten Methoden leicht darstellbaren ausgeprägten Kollagenfasernetze unterliegen während der Follikelreifung auch Veränderungen (23,24). In histologischen Studien konnte eine Disintegration ihres Bindegewebes gezeigt werden, begleitet von einer Auflösung der Grundsubstanz und einer gleichzeitigen Reduktion und Dissoziation der kollagenen Fasern (19). Als Mediatoren der Disintegration vermutet man proteolytische Enzyme (23,25) oder auch kollagenase-ähnliche Enzyme (18,62), als auch andere nicht enzymatische Substanzen (25). Die Anzahl der Fibroblastenschichten verringert sich wesentlich und die gesamte Wandstärke nimmt zum Zeitpunkt der Ovulation hin um weit mehr als die Hälfte ab (20, 70).

Die Fibroblasten der Tunica albuginea und der Theka externa, aber auch das Keimepithel enthalten im elektronenmikroskopischen Bild Mikrovesikel,

lysosomenähnliche Einschlüsse, die kurz vor der Ovulation aus den Zellen in das Interstitium ausgestoßen werden (3,11). Dort verschwinden die Vesikel und anschließend beginnt die Disintegration der Bindegewebsstrukturen (3,22).

Weiterhin weichen die Zellen der Membrana granulosa auseinander und durchdringen mit langen Fortsätzen die Basalmembran (3). In der Theka interna verwandeln sich ein Teil der Zellen in große, schaumige Epitheloidzellen (59). Das Keimepithel flacht von einer kubischen zu einer mehr ausgezogenen, rechteckigen Form ab (19) und zeigt Nekrosen in der Nähe des Stigmas, einer sichtbar dünneren Stelle auf der Follikeloberfläche. Die Ovulation könnte somit auch durch die Andauung eines devitalisierten Stigmas eintreten (18,21, 54).

Makroskopisch wurden an Ovarien in vivo Kontraktionswellen beobachtet, die über die ganze Oberfläche des Ovars laufen, zum Zeitpunkt der Ovulation hin frequenter werden und an Stärke zuzunehmen scheinen (13,53,60,73,74). Auch an in Meßvorrichtungen eingespannten Ovarien und Follikelhautstreifen wurden spontane Kontraktionen registriert (51,73). Mit empfindlichen Druckmeßgeräten konnten auch die geringen, durch die Kontraktionen hervorgerufenen Druckänderungen aufgezeichnet werden (16).

Lipner und Maxwell (39) implantierten Follikel in die vordere Augenkammer beim Kaninchen. S.c. Injektion von Urin schwangerer Frauen, die Gabe von Hypophysenextrakt und die elektrische Stimulation der Zervix bewirkten sichtbare Kontraktionen und eine Formveränderung des Follikels

von einer Kugelform in ein Ellipsoid.

Diese Beobachtungen lassen auf die Anwesenheit von kontraktile Strukturen im Ovar und auch in der Follikelhaut schließen. Die Existenz von glatten Muskelzellen im Ovar wurde schon 1849 von Kölliker (37) beschrieben. Thompson 1919 (68) und Guttmacher & Guttmacher 1921 (30) lokalisierten die Zellen der glatten Muskulatur in der Theka externa, konnten aber keine funktionelle Aktivität der Muskulatur nachweisen. Inzwischen ist versucht worden, die kontraktile Elemente in der Follikelwand näher zu bestimmen und ihre Reaktion auf verschiedene Reize zu testen.

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden im Stroma oder in der Follikelwand bei der Ratte (48,49,52), beim Kaninchen (9,45), bei der Katze (9,45), beim Affen (52), beim Meerschweinchen (9), beim Schaf (50) und beim Menschen (45) glatte Muskelzellen oder fibromuskuläre Zellen gefunden, deren sichere Abgrenzung untereinander und von Fibroblasten in einigen Fällen nicht möglich war (9). Die Anzahl der kontraktionsfähigen Elemente war nicht nur von Species zu Species verschieden, sondern variierte auch innerhalb derselben.

Es konnten jedoch nicht immer glatte Muskelzellen oder fibromuskuläre Zellen nachgewiesen werden. Unter dem Polarisationsmikroskop fand Claesson (12) beim Schwein, Meerschweinchen, Kaninchen und in Übereinstimmung mit Friedkalns (59) beim Rind keine glatte Muskulatur. Auch in elektronenmikroskopischen Studien der gleichen Species gelangte man zu unterschiedlichen Resultaten. Im Gegensatz zu Okamura (45) fand Espey

(16,19) beim Kaninchen keine Hinweise auf glatte Muskelzellen.

Mit verschiedenen biochemischen Reizversuchen arbeitete man an einer näheren Bestimmung der kontraktile Strukturen und ihrer Eigenschaften. Neurotransmitter wie Noradrenalin, Adrenalin, Isoproterenol, Acetylcholin, Hormone wie Oxytocin und Gonadotropine, Gewebshormone mit Wirkung auf glatte Muskulatur wie Serotonin, Histamin und Prostaglandine wurden am Ovar und am Follikelhautstreifen getestet (14,15,30,45,46,71,72,73,74).

Mit Antagonisten überprüfte man selektiv die Wirkung einzelner Substanzen auf die Follikelhaut und postulierte nach ihrem Kontraktionsverhalten Alpha-Rezeptoren (51) und H_1 -Rezeptoren (28). Die Aktivitätszunahme auf erregende Substanzen äußerte sich entweder in einer Erhöhung der Kontraktionsfrequenz oder in einem Anstieg der Kontraktionsamplitude, manchmal aber auch gleichzeitig mit beiden Phänomenen.

Auch durch Stimulation der sympathischen und parasympathischen Versorgung des Ovars mittels elektrischer Nervenreizung konnten Modifikationen der Kontraktionsfrequenz als auch der Kontraktionsamplitude hervorgerufen werden (27,79). Die Bedeutung der Innervation des Ovars blieb aber unklar, da die Follikelreifung und der Ovulationsablauf auch bei vollständiger Denervation ohne erkennbare Veränderungen stattfand (79).

In Versuchen mit direkter elektrischer Stimulation von Teilen der Follikelwand konnten ebenfalls Kontraktionen nachgewiesen werden (47).

Der Nachweis der Kontraktionsfähigkeit des Ovars und der Follikelmembran, die Ansprechbarkeit auf bestimmte Neurotransmitter und auf nervale Stimulation, die beobachtete Zunahme der Kontraktionsaktivität zum Zeitpunkt der Ovulation lassen eine Mitbeteiligung der Kontraktionen am Mechanismus der Ovulation vermuten.

Das Ziel dieser Arbeit sollte deshalb sein, die Kontraktionsfähigkeit der Follikelhaut des Graaf'schen Follikels während der Reifung bis hin zur Ovulation zu untersuchen. Ist eine unterschiedliche Kontraktilität in Abhängigkeit vom Reifestadium festzustellen?

Weiterhin sollte mit licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen nach der Art der kontraktile Elemente in der Follikelwandung des Rindes gesucht werden. Welche Strukturen sind das morphologische Substrat der Kontraktionen? Sind die Kontraktionen ein Auslösefaktor der Ovulation?

VERSUCHSPLANUNG UND METHODE

1. Überlegungen zur Untersuchungsmethode

1.1. Die kontraktile Elemente in der Follikelmembran

Nach dem jetzigen Stand der Untersuchungen wird die Kontraktilität der Follikelmembran von glatten Muskelzellen oder von besonders differenzierten Fibroblasten hervorgerufen (45).

Es ist bekannt, daß die kontraktionsfähigen Einheiten sowohl in den glatten Muskelzellen (7) als auch in Fibroblasten und fibroblastenähnlichen Zellen (78) aus Aktin- und Myosinfilamenten bestehen. Der Aufbau dieser Einheiten entspricht dem in der quergestreiften Muskulatur, ohne jedoch mit der gleichen Regelmäßigkeit wie in der quergestreiften Muskulatur angeordnet zu sein. Der Kontraktionsmechanismus ist aber der gleiche. Die Spannungsentwicklung* beruht auf einem Ineinandergreifen der Aktin- und Myosinfilamente unter Verbrauch des Energieträgers ATP (7).

Das Maximum der Spannungsentwicklung dieser kontraktile Einheiten hängt von ihrer Längenvordehnung ab. Bei einer zu geringen Vordehnung sind die Aktin- und Myosinfilamente nicht weit genug auseinandergezogen, um über eine Längenverkürzung eine größere Spannungsentwicklung zu ermöglichen. Bei einer zu geringen Gewebsvordehnung sind außerdem die serienelastischen Elemente des Gewebes, vor allem die Zellwände und die kollagenen Fasern, nicht genügend angespannt, um eine Kraftübertragung auf die Enden des Gewebestücks

zu ermöglichen. Andererseits sind bei einer zu großen Längenvordehnung die Aktin- und Myosinfilamente zu weit auseinandergezogen, um mit ihrer geringen Überlappungsfläche eine größere Spannung erzeugen zu können. Es gibt daher für diese Art der kontraktile Elemente einen Bereich der Vordehnung, in dem sie das Maximum ihrer Spannungsentwicklung erreichen können (36).

Das Gewebe der Follikelmembran ist von Follikel zu Follikel unterschiedlich in der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung und ändert sich rasch im Laufe der Reifung (62). Der wechselnde Gehalt an kollagenen Fasern, intraindividuelle Unterschiede in der Gewebszusammensetzung und die sich ändernde Gewebselastizität in Abhängigkeit vom Reifegrad des Follikels lassen eine direkte Messung der Kontraktionskraft nicht zu. Es sollen deshalb unter der Annahme, daß es sich bei den kontraktile Strukturen um ähnliche wie die der glatten Muskulatur handelt, Vorversuche durchgeführt werden.

Um die Kontraktionsfähigkeit der Follikelmembranen vergleichbar messen zu können, muß eine Übersicht über die Abhängigkeit der Kontraktionsstärke von der Größe der Vordehnung erstellt werden, und zwar mit den vorkommenden Follikelgrößen und Entwicklungsstadien als Parameter.

Ebenso müssen mögliche Kontraktionsunterschiede auf Grund intraindividuelle Verschiedenheiten der Follikel ausgeschlossen werden. Vergleichende Messungen sollen deshalb an äquivalenten Teilen ein und derselben Follikelwand durchgeführt werden. Nur dann läßt sich eine Aussage über den optimalen Bereich der Vordehnung machen und aus-

schließen, daß Kontraktionsunterschiede verschiedener Follikel und Follikelgrößen auf einem zu unterschiedlichen Optimum der Vordehnung beruhen.

* Als Spannung ist in dieser Arbeit die Kraft pro Materialquerschnitt definiert.

$$S = \frac{K}{q} \quad \boxed{\frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}}$$

Die Höhe der Spannungszunahme entspricht direkt der Kontraktionsfähigkeit des Gewebes. In den Kontraktionsversuchen wird jedoch nicht die Spannungsänderung selbst, sondern die von einem bestimmten Materialquerschnitt entwickelte Kraft gemessen.

1.2. Die physikalischen Eigenschaften der Follikelmembran: Elastizität und Plastizität

Die Follikelwand besteht sowohl aus zelligen Elementen wie den Granulosa- und Theka internazellen, den Fibroblasten der Theka externa und der Tunica albuginea, den Endothelzellen und der glatten Muskulatur der Gefäße (58), als auch den Zwischenzelementen wie kollagenen Fasern (19, 24), ferner retikulären Fasern in der Theka interna (59) und amorphen Zwischenzellsubstanzen (22). Die Gesamtheit der Elemente gibt der Follikelmembran elastische und plastisch-visköse Eigenschaften.

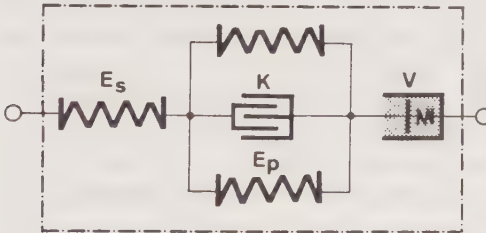


Abb. 1: Schema der Anordnung kontraktiler, visköser und elastischer Elemente in der Follikelwand. E_s : Serienelastizität, E_p : Parallelelastizität, V : visköse Komponente, K : kontraktiles Element.

In Untersuchungen hat Rondell (62) gezeigt, daß das physikalische Verhalten der Follikelmembran

in Hinsicht auf Elastizität und Plastizität vergleichbar dem der glatten Muskulatur ist.

Zur besseren Veranschaulichung stellt Abb. 1 ein mögliches Modell der Follikelwand dar, um das Verhalten der Wand bei passiver Dehnung und aktiver Kontraktion zu beschreiben.

Der parallelelastischen Komponente E_p können möglicherweise zum großen Teil die kollagenen Fasern zugerechnet werden, der serienelastischen Komponente E_s mehr die Kombination aus Zellwänden und Zwischenzellverbindungen (36). Die Ursache der ausgeprägten Plastizität der Membran (62) wird hauptsächlich in dem zähflüssigen Zytoplasma der Zellen und in den amorphen Zwischenzellsubstanzen gesehen. Bei der Dehnung der Follikelwand tritt durch das plastisch-visköse Verhalten eine passiv nicht mehr reversible Verlängerung ein. Nur durch einen aktiven Prozess ist eine Rückformung in die Ausgangslänge möglich (36).

Während der Entwicklung des Follikels zum sprungreifen Follikel oder zur Atresie ändert sich der Anteil und die Strukturierung der kollagenen Fasern (22), es tritt eine Veränderung der Zellen selbst ein, z.B. die Luteinisierung der Theka interna, so daß sich damit die elastischen und plastischen Eigenschaften der Follikelhaut in relativ kurzer Zeit entscheidend verändern können.

Aus diesen Eigenschaften der Follikelmembran und deren zeitlicher Modifikation ergeben sich für die Versuchsdurchführung folgende Voraussetzungen:

1. Für die Beurteilung der Kontraktilität ist eine Übersicht über das Vordehnungs-Kontraktions-

Verhalten notwendig (vgl. II.1.1.). Da aber bei konstanter Vorlast und gleichem Gewebsquerschnitt auf Grund der unterschiedlichen Elastizität trotzdem eine unterschiedliche Längenvordehnung der kontraktiven Elemente erfolgt, ist dies ein weiterer Grund für eine vorausgehende Untersuchung der Vorlast-Kontraktionskraft-Abhängigkeit.

2. Der Querschnitt der Gewebprobe muß durch eine geeignete Präparationstechnik so konstant wie möglich gehalten werden, um eine weitere Variable auf die Längenvordehnung auszuschalten.
3. Auf Grund der großen Plastizität muß der Follikelhaut eine ausreichende Zeit zur Anpassung an eine Vorlast gegeben werden, damit bei jeder Kontraktion mit einer gleichen Ausgangslage der elastischen und kontraktiven Elemente gerechnet werden kann. Bei der Präparation ist die Follikelhaut vorsichtig zu behandeln, um nicht größere plastische Veränderungen als durch die Vorlast selbst hervorzurufen.

1.3. Überlegungen zur Meßmethode

Messungen an kontraktile Systemen können grundsätzlich auf zwei verschiedene Meßmethoden zurückgeführt werden - die isotonische und isometrische. Die isotonische Meßmethode mißt die Längenänderung des Meßobjekts bei einer konstanten Vorlast. Mit der isometrischen Methode bestimmt man die Kraftentwicklung bei konstanter Länge des Meßobjekts (63).

Bei der Follikelmembran gibt es physiologischerweise keine isotonische Kontraktion, weil die Follikelmembran ein inkompressibles mit Flüssigkeit gefülltes Volumen umschließt. Lediglich nach dem Follikelsprung könnte eine isotonische Kontraktion bei der Austreibung des Follikelinhalts von Bedeutung sein.

Dagegen interessiert die Fähigkeit der Membran, über eine isometrische Kontraktion eine Spannung entwickeln zu können, die dann sekundär über elastisch-plastische Veränderungen zum Einriß der Follikelwand beitragen könnte.

Die isometrische Meßmethode ist daher geeignet, die Kontraktilität der Follikelwand zu erfassen. In der Praxis ist jedoch keine reine isometrische Kontraktionsmessung möglich. Jedes Meßsystem benötigt zur Kraftmessung eine Längenänderung. Ein gutes Meßsystem wie der Dehnungsmeßstreifen erfordert für die Kraftmessung aber eine außerordentlich kleine Wegänderung im Vergleich zu den plastischen Verschiebungsvorgängen im Gewebe selbst, so daß eine ausreichende Meßgenauigkeit für die isometrische Kontraktionsform gegeben ist.

1.4. Der Begriff der Wandspannung

Die Wandverhältnisse und der Aufbau eines Follikels entsprechen idealisiert einer Kugel mit der Wandstärke w , dem Innenradius r und einem Innendruck p , wobei p die Differenz zwischen Innen- und Außendruck ist.

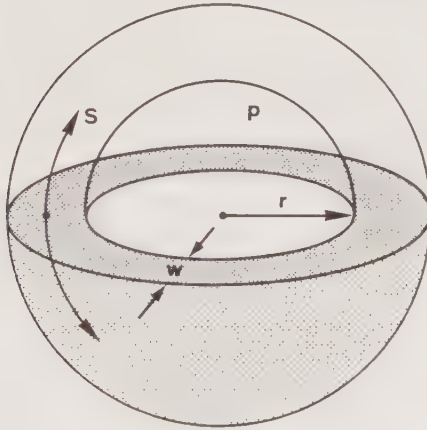


Abb. 2: Physikalisches Modell eines Follikels.

Die Wandspannung ist definiert als Kraft pro Materialquerschnitt (vgl. II.1.1.). Man kann sich die Kugel aus zwei Halbkugeln zusammengesetzt vorstellen, die vom Innendruck p mit der Kraft $K = r^2 \cdot \pi \cdot p$ auseinandergedrückt werden. Die Gegenkraft wird von der Wandspannung S über die Querschnittsfläche der Wand mit $K = 2 \cdot r \cdot \pi \cdot w \cdot S$ ($w \ll r$) geliefert.

Durch Gleichsetzung der beiden korrespondierenden Kräfte ergibt sich für die Berechnung der Wandspannung:

$$S = \frac{r \cdot p}{2 \cdot w} \quad \boxed{\frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}}$$

Diese Formel gilt unter der Voraussetzung, daß die Wandstärke w im Verhältnis zum Innenradius r sehr klein ist, welche beim Follikel ausreichend erfüllt ist.

Die Wandspannung der Kugel oder des idealisierten Follikels hängt also direkt proportional vom Innenradius und Innendruck, indirekt proportional von der Wandstärke ab.

1.5. Die Eigenschaften von Histamin

Histamin ist ein Gewebshormon, von der Struktur ein biogenes Amin, und kommt im Körper an vielen Stellen gehäuft vor. Histamin zeigt an der glatten Muskulatur je nach Lokalisation nahezu gegensätzliche Wirkungen. An der glatten Muskulatur der Gefäße bewirkt Histamin eine Dilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Dagegen wirkt Histamin an glattmuskulären Organen wie Bronchien und Darm kontrahierend (38).

Die Wirkung von Histamin wurde bereits in früheren Arbeiten mit unterschiedlichen Ergebnissen getestet. O'Shea (51) beschreibt eine dilatierende Wirkung auf das Ovar des Schweins, während bei Untersuchungen am isolierten Follikelhautstreifen des Rindes (28) Histamin eine Kontraktion hervorrief.

Die meisten pharmakologischen Arbeiten belegen, daß Histamin nicht über die Erregung nervöser Elemente seine Wirkung ausübt, sondern an einem eigenen Rezeptor an der Zellmembran der glatten Muskelzelle angreift und dort auch durch Antihistaminika zu blockieren ist (31).

Auf Grund dieser Eigenschaften scheint Histamin als kontraktionsauslösende Testsubstanz am Follikelhautstreifen des Rindes geeignet, weil durch die dilatierende Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur (43,67) angenommen werden kann, daß Kontraktionen der Follikelmembran nicht von den zahlreichen Gefäßen in der Theka interna und Tunica albuginea beeinflußt werden. Außerdem entfallen durch den direkten Angriffspunkt an der Zellmembran mögliche Modifikationen auf nervalem Wege

(79) oder Reifungsprozesse an den Endtrauben der Nerven.

Um die maximale Kontraktionsfähigkeit der Follikel bestimmen zu können, mußte eine unterschiedliche Ansprechbarkeit der Follikelhautstreifen auf eine bestimmte Histaminkonzentration soweit wie möglich ausgeschlossen werden. Eine unterschiedliche Ansprechbarkeit durfte nicht eine verschieden starke Kontraktionsfähigkeit vortäuschen. Die Testdosis mußte daher so hoch sein, möglichst im Sättigungsbereich oder an der Grenze der Sättigung, um die größtmögliche Kontraktion hervorzurufen.

Andererseits durfte die Testdosis nicht unphysiologisch hoch sein, damit nicht irgendein negativer Einfluß auf Vorgänge oder Gegebenheiten entstand, die die Auslösung oder die Stärke der Kontraktion hemmen konnten.

Gotthardt (28) hat bereits für Histamin an Follikelhautstreifen des Rindes eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Diese Kurve wurde aber an Hand von isotonischen Messungen gewonnen und machte deshalb die Berechnung einer Dosis-Wirkungs-Kurve für die isometrische Meßmethode erforderlich.

Aus der isometrischen Dosis-Wirkungs-Kurve wurde dann eine geeignete Histamintestdosis nahe der Sättigungsdosis bestimmt.

2. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten Ovarien von frisch geschlachteten Rindern verschiedener Rassen. Die Ovarien stammten von Kühen aller Altersklassen. Für die Untersuchung wurden nur Ovarien mit Graaf'schen Follikeln mit mehr als 0,4 ml Innenvolumen herangezogen. Waren auf einem Ovar mehrere Follikel dieser Mindestgröße vorhanden, wurden bei einigen Ovarien alle Follikel für einen intraindividuellen Vergleich untersucht, bei anderen mit vielen kleinen Follikeln nur die größten ausgewählt.

3. Untersuchungsaufbau

3.1. Die Versuchsanordnung

Der gesamte apparative Meßaufbau bestand aus drei Einheiten: Dem Wasserbad mit der Meßkammer und dem elektrischen Meßwertaufnehmer, einem Gleichspannungsdifferenzverstärker und einem elektronischen Schreiber.

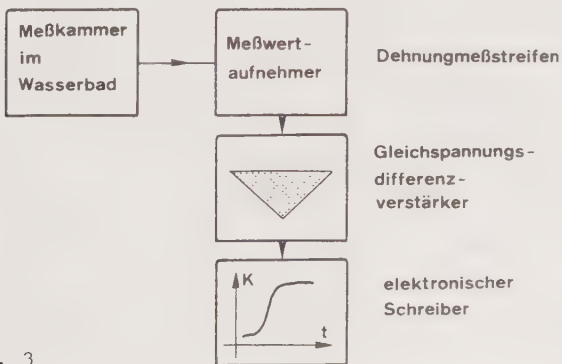


Abb. 3

Die eigentliche Meßkammer für die Aufnahme der Follikelhautstreifen bestand aus einem 70 ml Glaskolben mit einem Zu- und Ablauf für den Wechsel der Organbadlösung. Die Meßkammer tauchte in ein Wasserbad, dessen Temperatur mit einem Umwälzthermostaten konstant auf 37°C gehalten wurde. In diesem Wasserbad wurde ebenfalls der Vorratsbehälter mit der Organbadlösung vorgewärmt.

In der Meßkammer diente als unteres Widerlager für die vertikale Organaufhängung ein L-förmiger Glashaken. Mit einer fein ausgezogenen Glaskapillare wurde die Organbadlösung mit Carbogen (Mischungsverhältnis: 95% O_2 , 5% CO_2) begast. Die sehr kleinen aufsteigenden Gasblasen verursachten keinen wesentlichen Störpegel.

Die zu messende Kraft wurde über die obere Aufhängung auf einen Dehnungsmeßstreifen übertragen und in ein elektrisches Signal umgeformt. Der verwendete DMS (Fa. H. Sachs, Hugstetten) hatte neben einer hohen Federkonstante eine große Empfindlichkeit und war damit gut für die isometrische Messung geeignet.

Um eine hohe Meßgenauigkeit zu erhalten, wurde die Meßstrecke Widerlager-Organ-Meßkopf durch einen soliden Aufbau soweit wie möglich von Eigenelastizitäten frei gehalten. Dazu trugen der starre Glashaken und die Aufhängung des Follikelhautstreifens mit einem feuchtigkeitsunempfindlichen und unelastischen dünnen Polyesterfaden bei.

Die direkt proportional zur Kontraktionskraft im DMS entstandene Gleichspannung wurde über einen hochverstärkenden Gleichspannungsdifferenzverstärker linear verstärkt und auf einem elektronischen Schreiber (Linseis, 2-Kanal) in Darstellung ihres zeitlichen Ablaufs aufgezeichnet.

3.2. Hilfsmittel

Die Zusammensetzung der Organbadlösung

Die verwendete Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl 0,8 %, KCl 0,02 %, CaCl 0,02 %, $MgCl_2$ 0,01 %, $NaHCO_3$ 0,1 %, NaH_2PO_4 0,005 %, Dextrose 0,1 %.

Ionale Zusammensetzung mmol/l :

Na^+ 149,3 , K^+ 2,7 , Ca^{++} 1,8 , Mg^{++} 1,05 , Cl^- 145,4 , HCO_3^- 11,9 , $H_2PO_4^-$ 0,4.

Bei Begasung mit Carbogen stellt sich der pH der Lösung bei 37°C auf 7,4 ein.

Die 3-fach Schneidevorrichtung (Abb. 4)

Um die geforderten gleichmäßigen Abmessungen der Follikelhautstreifen einhalten zu können, wurde ein kleines Schneidegerät verwendet. Zwischen 3 mm starken Plexiglasscheiben wurden drei Rasierklingen eingespannt.

Die Schneidevorrichtung wurde leicht und gleichmäßig auf der Follikeloberfläche aufgesetzt und mit einem schnellen Zug über die Follikelmembran gezogen. Dadurch ergaben sich drei genau parallele Schnitte im Abstand von 3 mm. Da die Haut beim intakten Follikel durch den Innendruck völlig gleichmäßig aufgespannt ist, wurde durch diese Methode eine schonende und gut reproduzierbare Präparation der Follikelhautstreifen möglich.

Die Streifenbreite von 3 mm wurde einmal aus der Überlegung gewählt, daß die Hautstreifen einen

genügend großen Querschnitt für eine deutliche Kontraktion aufweisen sollen und kleine Ungenauigkeiten am Rand der Schnittfläche ohne Bedeutung bleiben. Andererseits sollte die Schnittbreite aber so schmal sein, um auch noch von kleinen Follikeln (Volumen etwa 0,5 ml) zwei Streifen aus der Oberfläche zu erhalten.

Die Längenpräpariervorrichtung (Abb. 5)

Da die Kontraktionsmessung in der Praxis keine rein isometrische sein kann, weil jede Kraftmessung mit einer Längenänderung verbunden ist (vgl. II.1.3.), kann sich möglicherweise das Verhältnis der Streifenlänge zur Längenänderung bei der Kontraktion auf die Genauigkeit der Messung auswirken. Daher sollte auch die Länge des Follikelstreifens konstant gehalten werden.

Die Längenpräpariervorrichtung ermöglichte es, den Hautstreifen unter einer bestehenden Vorlast schonend auf eine standardisierte Länge von 10 mm ($\pm 0,5$ mm) zu schneiden. Dabei wurde ein längerer Follikelhautstreifen (ca. 15 mm) so in die Vorrichtung gehängt, daß der obere Knoten der Organaufhängung sich mit der oberen Markierung deckte. Durch die 10 mm unterhalb liegenden Schlitzte wurde ein Faden gezogen und als untere Organaufhängung verknotet.

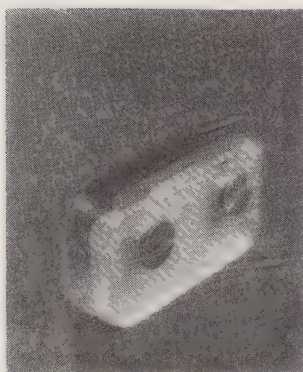


Abb. 4: Die 3-fach
Schneidevorrichtung.

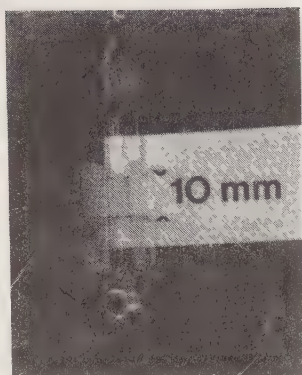


Abb. 5: Vorrichtung
zur Längenpräparation
des Follikelhautstrei-
fens.

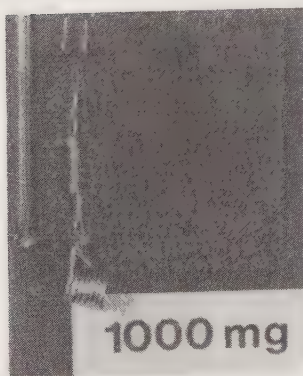


Abb. 6: Die Aufhän-
gung des Follikelstrei-
fens mit Vorlast.

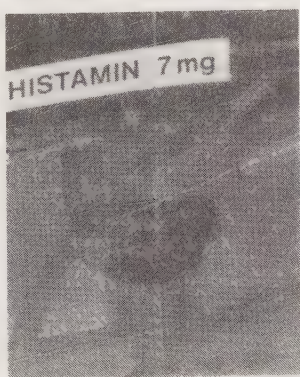


Abb. 7: Die Meßkammer
mit eingehängtem Fol-
likelhautstreifen.

4. Der Untersuchungsablauf

Die frisch entnommenen Ovarien wurden gekühlt transportiert und innerhalb einer dreiviertel bis einer Stunde nach der Entnahme weiterverarbeitet.

Zuerst wurde die Größe des Graaf'schen Follikels ermittelt. Der Follikel wurde dazu vorsichtig durch das Ovarialstroma mit einer feinen Nadel punktiert, ohne die Follikeloberfläche zu verletzen, und das Volumen der Follikelflüssigkeit bestimmt. Die Volumenbestimmung wurde als die wesentlich genauere Methode zur Größenmessung einer Durchmesserbestimmung von außen vorgezogen, weil viele Follikel mehr oval als sphärisch und unterschiedlich tief im Ovarialstroma verankert waren.

Nach der Volumenmessung wurde der Follikel durch die liegengebliebene Nadel mit der entnommenen Flüssigkeit wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

Die nun wieder mit dem gleichen Innendruck belastete Follikelwand wurde dann mit der 3-fach Schneidevorrichtung quer über die Follikeloberfläche eingeschnitten.

Mit einer feinen Pinzette wurde unter jedes Ende der vorgeschnittenen Follikelhautstreifen ein Faden untergeschleift und dort fest verknotet, ohne einen Zug auf den Hautstreifen auszuüben. Die Fadenenden erhielten Schlaufen und mit einer Schere wurde der präparierte Streifen aus der Follikelwand herausgelöst. Das untere Ende wurde mit einer definierten Vorlast aus versilbertem Cu-Draht beschwert und der Follikelhautstreifen zur Vorinkubation 45 min lang in eine auf 37°C temperierte

mit Carbogen begaste Tyrodelösung gehängt (Abb. 6), um dem Follikelhautstreifen die Anpassung an das Milieu zu gewähren und damit möglicherweise durch Temperaturunterschiede, Änderungen des pH-Werts und Elektrolytverschiebungen hervorgerufene Reizreaktionen auszuschalten.

Für den eigentlichen Meßvorgang wurde der Streifen zusammen mit der Vorlast aus dem Vorinkubationsbad genommen und in der Längenpräpariervorrichtung auf die Standardlänge von 10 mm gekürzt. Die Ausführung dauerte nicht länger als 20 Sekunden. Die obere Schlaufe wurde in den Haken des Dehnungsmeßstreifens, die untere zusammen mit der Vorlast in den Glashaken eingehängt (Abb. 6). Über einen Feintrieb wurde der Follikelstreifen so eingestellt, daß die untere Schlaufe mit der Vorlast gerade am Glashaken anlag und die Meßstrecke keine Eigenelastizität mehr aufwies.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min wurde der Tyrodelösung in der Meßkammer eine definierte Dosis Histamin zugegeben (Abb. 7). Das im Verhältnis zur Meßkammer (70 ml) geringe Volumen der Histaminlösung (0,7 ml) veränderte weder die Temperatur noch die vorliegenden Konzentrationen der Tyrodelösung entscheidend. Die induzierte Kontraktion wurde auf dem elektronischen Schreiber aufgezeichnet.

Nach jeder Messung wurde die Meßkammer mehrmals sorgfältig mit Tyrodelösung gespült und für die nächste Messung wieder frisch aufgefüllt.

5. Die Anfertigung der histologischen Präparate

5.1. Präparate für das Lichtmikroskop

Die Follikelhautstreifen wurden sofort nach der Messung in 5 %igem Formol fixiert.

Nach der Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Hautstückchen in Parafin eingebettet und auf dem Mikrotom in 3 μ m dicke Schnitte zerlegt.

Die Schnitte wurden zwei verschiedenen Färbungen unterzogen (26).

1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung diente in der Untersuchung als Übersichtsfärbung und zur Differenzierung der Entwicklungsstadien.

2. Trichromfärbung nach Masson (modifiziert nach Goldner)

Die Massonfärbung ist eine Bindegewebsfärbung, ermöglicht es aber auch, das Zytoplasma bestimmter Zellen in unterschiedlicher Farbtönung sichtbar zu machen. Die Massonfärbung erlaubt eine leichtere Differenzierung der Zellen von den umgebenden Faserstrukturen. Außerdem gestattet diese Färbung die Unterscheidung glatter Muskelzellen von Bindegewebszellen.

Färbecharakteristik der Trichromfärbung:

Kerne	-	braunschwarz
Zytoplasma	-	ziegelrot
glatte Muskelzellen	-	blaßrosa
Bindegewebe	-	leuchtend grün

5.2. Präparate für das Elektronenmikroskop

Die Gewebestückchen wurden für die Untersuchung mit dem Transmissionselektronenmikroskop in 2,5 %iger Glutaraldehyd bei pH 7,3 und 4°C' 30 min lang fixiert.

Danach wurde das Gewebe 10 min lang in Millonig-Puffer bei pH 7,3 ausgewaschen und in 1 %iger Osmiumsäure bei 4°C' postfixiert.

Die Gewebestückchen wurden dann wieder mit Millonig-Puffer gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Die Einbettung erfolgte in Epon. Von den eingebetteten Follikelhautstreifen wurden zur Übersicht und zur Auswahl interessanter Areale Semidünnschnitte in einer Stärke von 0,5 μ m angefertigt. Die Schnitte wurden nach einer Übersichtsfärbung mit Toluidinblau oder Methylenblau lichtmikroskopisch durchgemustert und Bezirke für die Elektronenmikroskopie gekennzeichnet.

Mit dem Ultramikrotom wurden Ultradünnschnitte in der Stärke von 500 Å angefertigt und auf Kupfernetzchen aufgebracht.

Anschließend wurden die Schnitte in einer gesättigten alkoholischen Uranylacetatlösung und in Bleicitrat kontrastiert.

In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde nach dem morphologischen Substrat der Kontraktionen gesucht und versucht, die kontraktile Strukturen zu charakterisieren.

Von aufschlußreichen Beobachtungen wurden Fotoaufnahmen angefertigt.

ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der Voruntersuchungen

1.1. Bestimmung einer geeigneten Histamintestdosis

Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit für Histamin (vgl. II.1.5.) wurden 23 Messungen an 12 verschiedenen Follikeln von 9 Ovarien in der Größenordnung von 0,4 ml - 15,0 ml durchgeführt. Die Vorlast betrug bei allen Messungen 500 mg.

Es hat sich schon in früheren Arbeiten gezeigt, daß die Follikelhautstreifen in Kontraktionsversuchen mit Histamin ausgeprägt das Phänomen der Tachyphylaxie aufweisen (28). Um bei dieser Untersuchung eventuelle Auswirkungen dieses Phänomens auf die Meßgenauigkeit so gering wie möglich zu halten, wurden die einzelnen Testdosen in einer aufsteigenden Reihenfolge dem Organbad zugegeben. Es wurde jedesmal die Konzentrationsdifferenz auf die nächsthöhere Testdosis in dem Moment zugefügt, in dem die vorherige Testdosis das Maximum der Kontraktion bewirkt hatte. Von jedem Follikel diente ein zweiter Streifen als Kontrollstreifen, der zur Absicherung der Meßergebnisse der gleichen Behandlung unterworfen wurde.

Die Follikelhautstreifen wurden mit Histaminkonzentrationen in der Reihenfolge von 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ und 1000 $\mu\text{g/ml}$ getestet.

Abb. 8 zeigt eine registrierte Kontraktionskurve für einen Follikelhautstreifen (Nr. 411). Die Zeitpunkte der Histaminapplikationen sind markiert. Der für jede Histaminkonzentration maximal erreichte Kontraktionswert ist auf der Ordinate ablesbar.

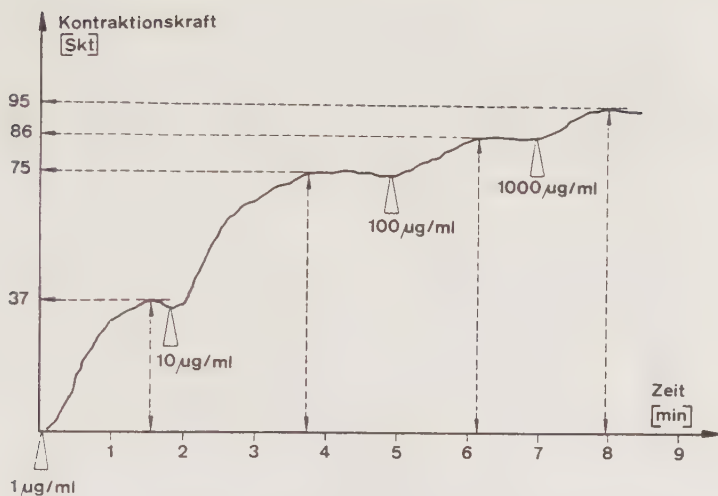


Abb. 8: Kontraktionsverlauf des Follikelstreifens Nr. 411 nach Zugabe der verschiedenen Histamintestkonzentrationen.

Die Gegenüberstellung der Meßwerte von Meßstreifen und dazugehörigem Kontrollstreifen bei den verschiedenen Histamintestkonzentrationen zeigt Abb. 9. Die Kontraktionswerte der Meßstreifen sind auf der Abszisse, die der Kontrollstreifen auf der Ordinate angetragen. Die Koordinatenpunkte eines Follikels für die vier Histaminkonzentrationen sind untereinander verbunden, zum großen Teil wurden jedoch nur drei Konzentrationen ausgetestet.

Die Proportionalität der Meßwerte zwischen Kontroll- und Meßstreifen für die einzelnen Histamindosen stellt sich in der Linearität der Verbindungslinien dar. Das Verhältnis der Kontraktionsstärken zwischen Kontroll- und Meßstreifen läßt

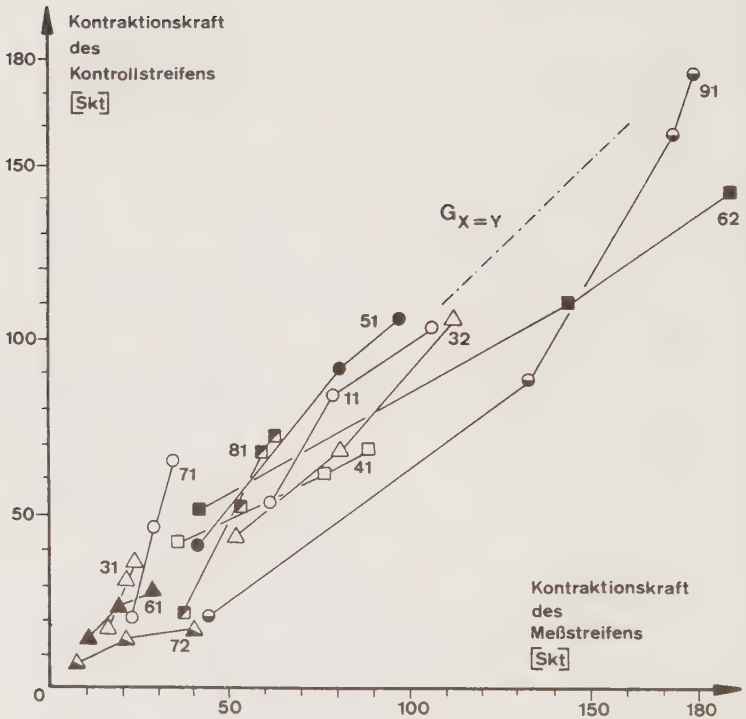


Abb. 9: Gegenüberstellung der Meßwerte von Meß- und Kontrollstreifen für die verschiedenen Histaminkonzentrationen.

sich aus der Entfernung der Koordinatenpunkte von der Geraden $G_{x=y}$ oder genauer aus dem Tangens des Winkels zwischen der Geraden $G_{x=y}$ und der Verbindung des Punktes mit dem Nullpunkt ablesen.

Nach Abb. 9 ergibt sich für die Meßwerte des Kontroll- und Meßstreifens eine gute proportionale

Abhängigkeit; die Verbindungslinien zeigen einen nahezu geradlinigen Verlauf. Auch die Absolutwerte beider Follikelhautstreifen gleichen sich relativ gut, besonders die von Follikeln mit größerer Kontraktionsamplitude. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Meßwerten und den Kontrollwerten beträgt +0,91 (76).

Bei den Follikeln Nr. 31, 71, 72 verlaufen die Verbindungslinien für die verschiedenen Histaminkonzentrationen auch relativ geradlinig, die Lage zur Gerade $G_{x=y}$ weicht jedoch mehr als bei den anderen Follikeln ab. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in den in dieser Meßreihe kleinsten Volumina (31: 0,6 ml; 71: 0,7 ml; 72: 0,4 ml), die bei der Kleinheit der Follikel schon zu präparatorischen Ungenauigkeiten geführt haben könnten.

Der Verlauf der anderen Kurven zeigt jedoch, insbesondere die gute Korrelation zwischen Meß- und Kontrollstreifen, daß die Meßmethode und die Versuchsbedingungen geeignet waren, vergleichbare Messungen an einem schwierigen biologischen Material durchzuführen. Die Meßwerte hingen im wesentlichen von den Kontraktionseigenschaften der Follikel ab.

Zwischen den einzelnen Follikeln differierten die Kontraktionsamplituden für eine bestimmte Histaminkonzentration beträchtlich. In Abb. 9 lassen sich Follikel mit besonders niedriger Kontraktionsamplitude (31, 61, 71, 72) von Follikeln mit mittlerer (11, 32, 41, 51, 81) und von Follikeln mit besonders hoher Kontraktionsamplitude (62, 91) abgrenzen.

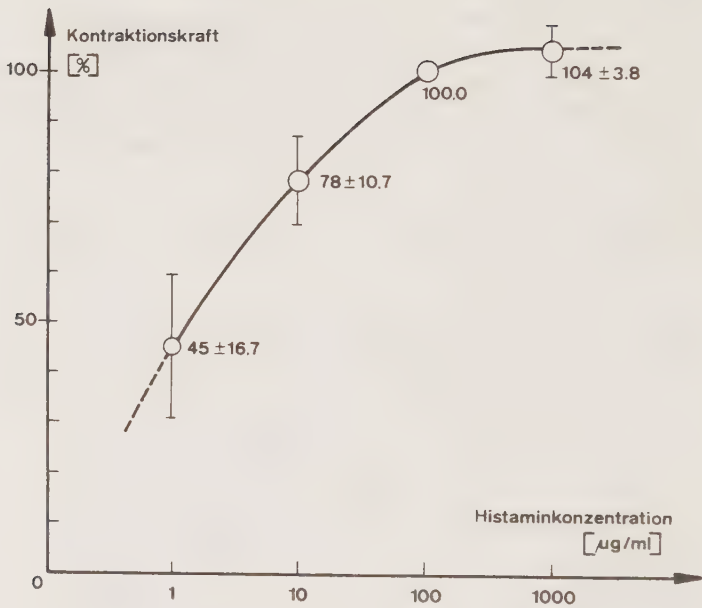


Abb. 10: Dosis-Wirkungs-Kurve für Histamin am isolierten Follikelhautstreifen, gemessen unter isometrischen Kontraktionsbedingungen.

Abb. 10 zeigt die ermittelte Dosis-Wirkungs-Kurve von Histamin für die isometrische Kontraktionsform am Follikelhautstreifen. In der Grafik wurde als gemeinsame Bezugsdosis $100 \mu\text{g/ml}$ angenommen und als 100 %-Marke gesetzt. Die übrigen Meßwerte wurden als Mittelwerte zusammen mit ihrer Standardabweichung in Relation zur 100 %-Marke eingetragen.

Entscheidend für die Auswahl der geeigneten Testdosis ist der nur geringe Kontraktionsanstieg bei der Steigerung der Histamindosis von 100 $\mu\text{g/ml}$ auf 1000 $\mu\text{g/ml}$. Außerdem liegt eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ durchaus noch in der Größenordnung der im Körper vorkommenden Histaminkonzentrationen (2,31,69). Deshalb wurde für alle nachfolgenden Kontraktionsversuche die Histamintestdosis auf 100 $\mu\text{g/ml}$ festgesetzt.

1.2. Die Bestimmung einer geeigneten Vorlast

Für die Bestimmung einer geeigneten Vorlast (vgl. II.1.1., 1.2) wurden 59 Follikelhautstreifen von 29 Follikeln 24 verschiedener Ovarien mit unterschiedlichen Vorlasten vorgedehnt und dann die Kontraktionskraft gemessen, wobei jeweils zwei Follikelhautstreifen ein und desselben Follikels mit unterschiedlichen Vorlasten gegeneinander verglichen wurden. Die Histaminkonzentration betrug bei allen Messungen 100 $\mu\text{g/ml}$. Als Vorlastvariable dienten vier Gewichte von genau 500 mg, 1000 mg, 1500 mg und 2000 mg. Für die Untersuchung wurden wiederum Follikel aller vorkommenden Volumina von 0,5 ml bis 31,0 ml ausgewählt, um zusätzlich auch eine Abhängigkeit der optimalen Vorlast von der Follikelgröße und von Entwicklungsstadien feststellen zu können.

Die gemessenen Kontraktionsamplituden der beiden Follikelhautstreifen eines Follikels in Abhängigkeit von der angegebenen Vorlast sind in Abb. 11 dargestellt.

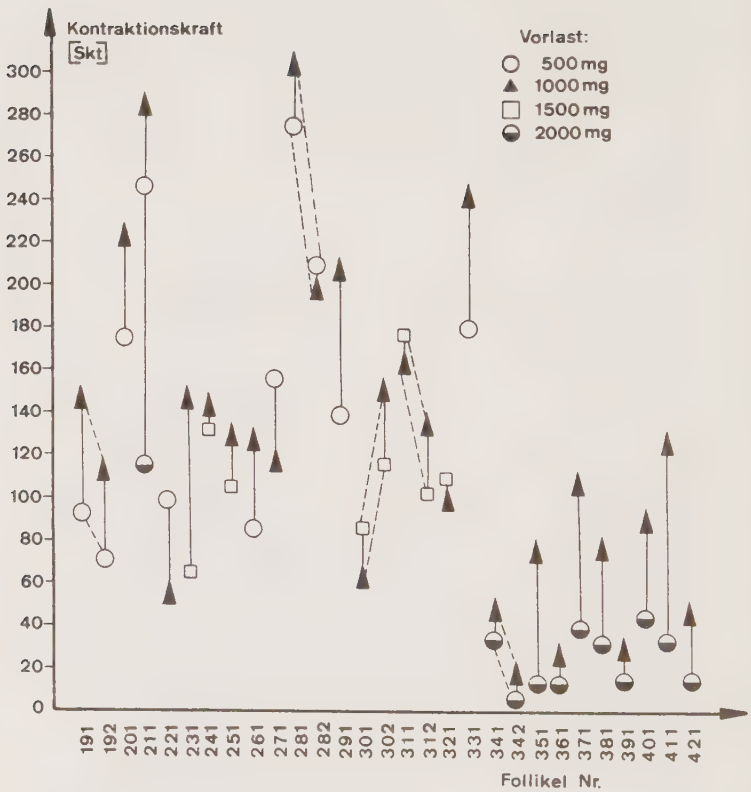


Abb. 11: Die Abhängigkeit der Kontraktionskraft von der Vorlast.

Die gestrichelten Verbindungslinien fassen die Follikel eines Ovars zusammen. Um die Kontraktionsunterschiede durch verschiedene Vorlasten in

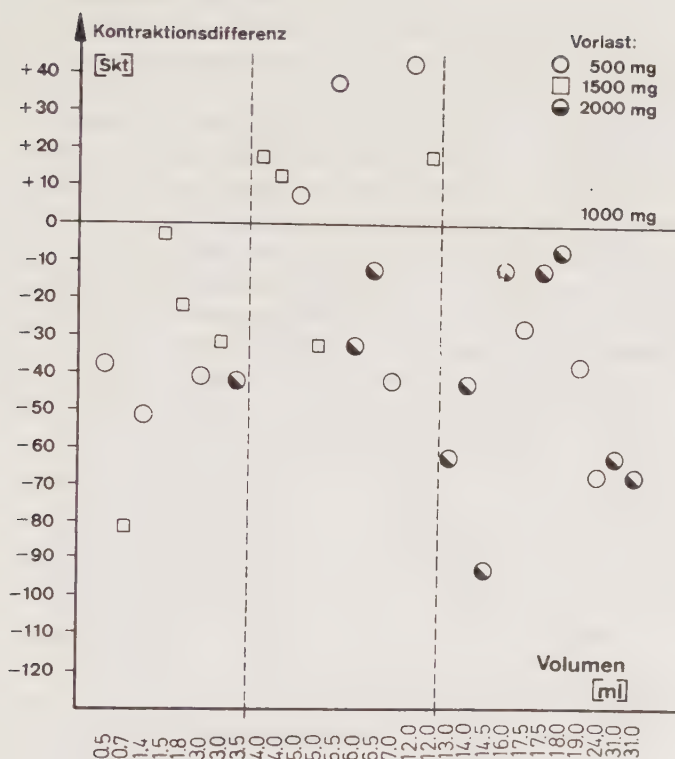


Abb. 12: Die absolute Kontraktionsdifferenz zwischen Follikelhautstreifen mit der Vorlast von 1000 mg als Bezugswert und einer variablen zweiten Vorlast in Abhängigkeit vom Follikelvolumen.

vom Volumen des Follikels darzustellen, wurden die absoluten Unterschiede der Kontraktionskraft der

entsprechenden Follikelhautstreifen in Beziehung zu dem Meßwert der 1000 mg Vorlast gesetzt und dem Volumen nach in Abb. 12 eingetragen. Die positiven Kontraktionsdifferenzen geben den Wert an, um den die Kontraktion des Follikelhautstreifens mit der angegebenen Vorlast größer ist als die des entsprechenden Streifens mit der 1000 mg Vorlast.

In der Abb. 12 läßt sich erkennen, daß der größte Teil der Follikelhautstreifen mit Vorlasten von 500 mg, 1500 mg und 2000 mg geringere Kontraktionsamplituden aufwies als die mit 1000 mg belasteten Streifen. Es lassen sich empirisch drei Volumenbereiche mit unterschiedlichem Vorlast-Kontraktionsverhalten aufstellen.

Im unteren Volumenbereich von 0,5 ml - 3,5 ml liegen sowohl die 500 mg - Werte als auch die 1500 mg - Werte deutlich unter den Kontraktionsstärken der 1000 mg Vorlast. In diesem Volumenbereich scheint ein relativ scharfes Maximum der Kontraktionskraft für die Vorlast von 1000 mg vorzuliegen. Messungen mit einer 2000 mg Vorlast wurden deshalb nicht durchgeführt.

Im Volumenbereich von 4,0 ml - 12,0 ml scheint das Optimum der Vorlast breiter gestreut zu sein. Es zeigten sich für einige Follikel für 500 mg und 1500 mg Vorlasten höhere Kontraktionsamplituden als für die 1000 mg Vorlast. Die Kontraktionswerte für die 2000 mg Vorlast lagen jedoch alle unter den 1000 mg - Werten.

Für die Volumina von 13,0 ml bis 31,0 ml ergaben sich für die 500 mg als auch für die 2000 mg Vorlasten in jedem Fall ein niedriger Kontrak-

tionswert als für die 1000 mg Vorlast. Das Kontraktionsoptimum lag daher zwischen den Vorlasten von 500 mg und 2000 mg.

Die optimale Vorlast sollte jedem Follikel unabhängig von seiner Größe und seinem Entwicklungsstadium die größtmögliche Wahrscheinlichkeit für eine maximale Kontraktion geben. Da das Optimum für die kleinen Follikel relativ scharf um die 1000 mg -Marke zu liegen scheint, für den mittleren Volumenbereich nicht so eng eingrenzbar ist und für die großen Follikel auch im 1000 mg -Bereich liegt, wurde für alle Messungen im Hauptversuch die Vorlast auf 1000 mg festgesetzt.

2. Ergebnisse des Hauptversuchs

2.1. Die histologische Beurteilung der Entwicklungsstadien im Lichtmikroskop

Von jedem der 79 Follikel der 58 Ovarien, die in der Kontraktionsbestimmung des Hauptversuchs durchgemessen worden waren, wurden anschließend zwei Präparate in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung und einer Masson-Färbung zur lichtmikroskopischen Beurteilung (vgl. II.5.1.) angefertigt. Die Präparate wurden nach histologischen Untersuchungen und Beschreibungen von Bjersing und Cajander (3,11) und nach Friedkalns und Weber (58,59) ausgewertet und nach histologischen Kriterien einem Entwicklungsstadium zugeordnet, ohne die Kontraktionsamplituden der zugehörigen Follikelhautstreifen zu kennen.

2.1.1. Allgemeine Entwicklung und Struktur der Follikelhaut

Die untersuchten Follikel befanden sich sowohl auf dem Weg der Reifung zum ovulationsbereiten Follikel, als auch von jedem Entwicklungsstadium über regressive Veränderungen in die Atresie. Eine makroskopische Unterscheidung von reifenden und atretischen Follikeln war nicht möglich. Im Untersuchungskollektiv waren ebenso auch auffällig große Follikelzysten vorhanden.

Die Wand des Graaf'schen Follikels enthält in einer groben Einteilung eine Epithel- und eine Bindegewebsschicht. Der Cumulus oophorus mit dem

Ei war in keinem Präparat zu beobachten, da er hauptsächlich zentral im Follikel liegt und das Untersuchungsmaterial nur aus der das Ovar überragenden Follikeloberfläche gewonnen worden war.

Die Granulosazellen, die bilden die innerste Schicht der Follikelwand, zeigten während des Wachstums gewöhnlich polygonale Form. Die der Basalmembran nahen Schichten waren dagegen oft säulenförmig und dicht gedrängt, mit einer dichten Chromatinverteilung (Abb.13).

Das Bindegewebe um die Epithelschicht, durch eine Basalmembran getrennt, läßt sich in eine innen liegende vaskularisierte Theka interna, eine sie umgebende Theka externa und die Tunica albuginea untergliedern.

Die Theka interna enthält locker zusammenhängende, unregelmäßig verteilte, spindelförmige Zellen (Abb. 13) und gegen das Ende der Reifung zur Ovulation zusätzlich große, polygonale Epitheloidzellen.

Die Theka externa entwickelt sich in ein um die Theka interna liegendes Stützgewebe, das nicht scharf von der Theka interna abzugrenzen ist. Sie enthält längliche, ausgezogene Fibroblasten und viele kollagenen Fasern (Abb. 13). Beide Thekaschichten sind von Gefäßen durchzogen, die in der Endphase zum sprungreifen Follikel stark proliferieren.

Die Tunica albuginea besteht im wesentlichen aus Fibroblasten, die in ein sehr dichtes und engmaschiges Kollagenfasernetz eingelagert sind.

Mitosen der Follikelwandzellen sind am häufigsten in der Frühphase des Graaf'schen Follikels zu finden. In der Membrana granulosa sind die Mitosen

gewöhnlich zahlreicher als in der Theka interna. In der Theka externa können nur wenige Mitosen beobachtet werden. Friedkalns (59) erachtete dies als Ursache dafür, daß die Theka externa während des Follikelwachstums nicht im erforderlichen Maße mitwächst und sich deshalb verdünnt und auseinandergezogen wird. Während des weiteren Follikelwachstums nimmt die Mitosehäufigkeit in allen Wandschichten ab und erreicht die niedrigste Rate kurz vor der Ovulation und im atretischen Stadium.

2.1.2. Präovulatorische und ovulatorische Veränderungen (Tag 18-21)

Drei bis vier Tage vor der Ovulation, nach der höchsten Mitoseaktivität, nehmen die Granulosazellen an Größe zu und weichen im Rahmen der Inaktivierung auseinander. Ihr Zytoplasma ist wenig anfärbbar und einige ihrer Zellkerne unterliegen dem pyknotischen Untergang. Die Granulosazellschicht und die Basalmembran zeigen kurz vor der Ovulation eine leichte Welligkeit (Abb. 16).

Die Zellen der Theka interna nehmen ebenso nach ihrer größten Mitoseaktivität an Größe zu. In der präovulatorischen Phase lassen sich in dieser Schicht deutlich zwei verschiedene Zellarten abgrenzen. Die eine, welche den größten Teil der Theka interna ausmacht, bleibt unverändert fibroblastenähnlich. Die andere Art entwickelt sich zu großen Epitheloidzellen (Abb. 14,15). Diese polygonalen Zellen besitzen einen leicht vakuoligen Kern mit hellen, fein verteilten Chromatinstrukturen und deutlichen Nukleoli. Vor der Ovulation

erscheinen die Blutgefäße der Theka interna gestaut. Die Schicht erreicht ihre größte Stärke und faltet sich zusammen mit der Granulosa.

Im Gegensatz zu Guttmacher und Guttmacher (30) beim Schwein, jedoch in Übereinstimmung mit Priedkalns (59) beim Rind, konnten lichtmikroskopisch weder in der Thekaschicht noch in der Tunica albuginea glatte Muskelzellen gefunden werden, ausgenommen die der Gefäßmuskulatur.

2.1.3. Atresie

Atretische Follikel konnten in allen Größenordnungen und von allen Entwicklungsstadien ausgehend beobachtet werden. Als bedeutendes Zeichen der Atresie sind Veränderungen der Zellkerne im Sinne von Pyknosen, Chromatolyse und die Kondensation von Chromatin an der Zellkernmembran zu finden. Diese Veränderungen und das Fehlen von mitotischer Aktivität wird zuerst an den Granulosazellen beobachtet.

Es lassen sich histologisch zwei verschiedene Arten der Atresie unterscheiden, die Atresie vom obliterativen Typ und vom zystischen Typ.

Während der Atresie vom obliterativen Typ verdickt und faltet sich die Basalmembran und von der Theka externa ausgehend wächst Bindegewebe durch die Theka interna hindurch in die Membrana granulosa ein. Kollagene Fasern vereinigen sich dabei mit der Basalmembran und hyalinisieren zu der sogenannten Glashaut. Die Zellen der Theka interna hypertrophieren und zerstreuen sich im umliegenden Gewebe. Unveränderte Fibroblasten

wachsen durch die Membrana granulosa in Richtung Follikelhöhle ein.

In größeren Follikeln ist die Atresie nach dem zystischen Typ häufiger (Abb. 17). Dabei atrophieren sowohl die Membrana granulosa als auch die Theka interna zu einer abgeflachten Zellschicht und sind je nach Phase der Atresie als solche nicht mehr zu differenzieren. Die Follikelwand ist zu einer reinen Bindegewebsmembran umgestaltet. In diesem Fall bildet sich keine Glashaut aus.

In einer Sonderform der zystischen Atresie atrophiert die Membrana granulosa, die Zellen der Theka interna dagegen hypertrophieren und luteinisieren. Innerhalb der Wand des atretischen Follikels bildet sich eine dicke Schicht von Luteinzellen aus oder es kommt zur Ansammlung von Luteinzellen in abgegrenzten Zellnestern (Abb. 18,19).

2.1.4. Die Klassifizierung der Entwicklungsstadien

Um zwischen den verschiedenen Follikelgrößen, den dazugehörigen Kontraktionsamplituden und dem Reifestadium des jeweiligen Follikels eine Abhängigkeit erkennen zu können, wurden die einzelnen Follikel nach einem histologischen Klassifizierungsschema mit vorher festgelegten Kriterien in Gruppen eingestuft.

Die Klassifizierung wurde in folgende Entwicklungsphasen unterteilt: Die Früh- und zwischenovulatorische Phase vom 1. - 17. Tag, die präovulatorische Phase vom 18. - 20. Tag, die ovulatorische Phase am 21. Tag und die Formen der Atresie.

Zeichenerklärung:

∅	nicht vorhanden
I	vereinzelt, wenige
II	mehrere
III	viele
EZ	Epitheloidzellen
FB	Fibroblasten
BG	Bindegewebe, kollagene Fasern

Früh- und zwischenovulatorische Phase

Diese Gruppe enthält Graaf'sche Follikel, deren Weiterentwicklung zum sprungreifen Follikel noch nicht begonnen hatte oder die sich im Zyklus bis ungefähr zum 17. Tag der Reifung befanden (Abb.13).

Granulosa	kleinzellig, dicht, Mitosen III
Basalmembran	glatt
Theka interna	kleinzellig, dicht, EZ ∅, Mitosen III, FB III, BG ∅
Theka externa	dicht, BG ∅-I

Präovulatorische Phase

Die beginnende Umstrukturierung zum sprungreifen Follikel war zu erkennen. Im Zyklus entsprach diese Phase etwa dem 18. - 20. Tag (Abb. 14).

Granulosa	beginnende Auflockerung, Mitosen I-II
Basalmembran	glatt
Theka interna	Auflockerung, Mitosen I-II, EZ I-II, FB I-II, BG ∅, Gefäße I-II
Theka externa	leicht ausgezogen, BG I-II

Ovulatorische Phase

Die Follikelhaut war nahezu oder vollständig umstrukturiert und kurz vor der Ovulation. Das Reifestadium entsprach dem 21. Tag (Abb. 15,16).

Granulosa	aufgelockert, Mitosen ϕ , Pyknosen
Basalmembran	gewellt
Theka interna	Mitosen ϕ , EZ III, FB I, BG ϕ , Gefäße III
Theka externa	dünn ausgezogen, BG III

Atresie

In dieser Gruppe befinden sich sowohl Follikel, die aus jedem Entwicklungsstadium in Regression begriffen waren und auch solche, die sich in Follikelzysten umgewandelt hatten (Abb. 17,18,19).

Granulosa	Mitosen ϕ , Pyknosen, BG I-II, Atrophie
Basalmembran	verdickt, hyalinisiert, gewellt, Glashaut oder unverändert
Theka interna	BG I-II, Atrophie, Zellunter- gänge, EZ ϕ -I oder schichtweise Luteinisierung oder Bildung von Luteinzellnestern
Theka externa	Atrophie, BG II-III

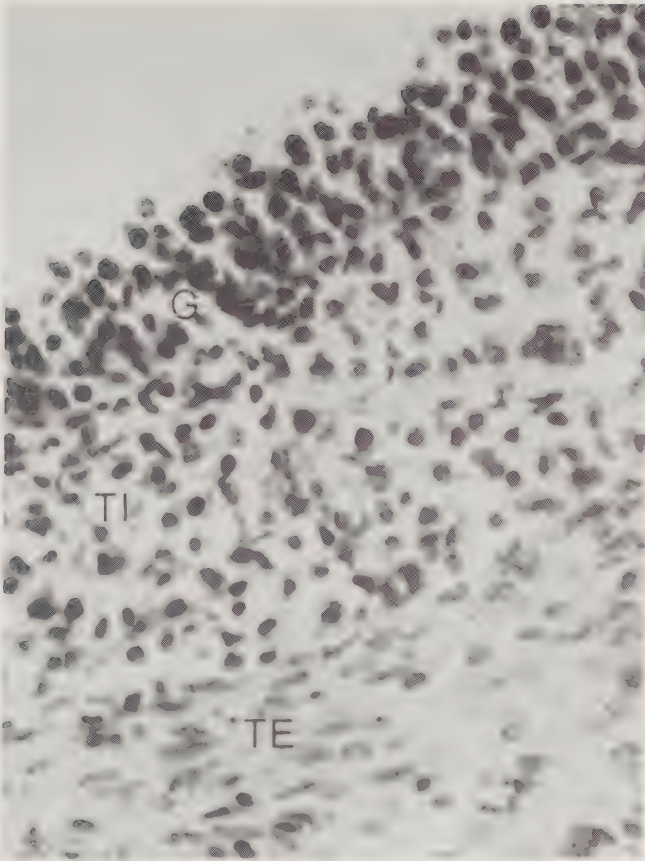


Abb. 12: Ausschnitt der Follikelwand in der Frühphase. Die Granulosazellen (G) sind dicht angeordnet, die Theka interna (TI) besteht aus locker zusammenhängenden, unregelmäßig verteilten Zellen und die Theka externa (TE) aus länglichen Fibroblasten. Masson-Färbung. 250-fach.

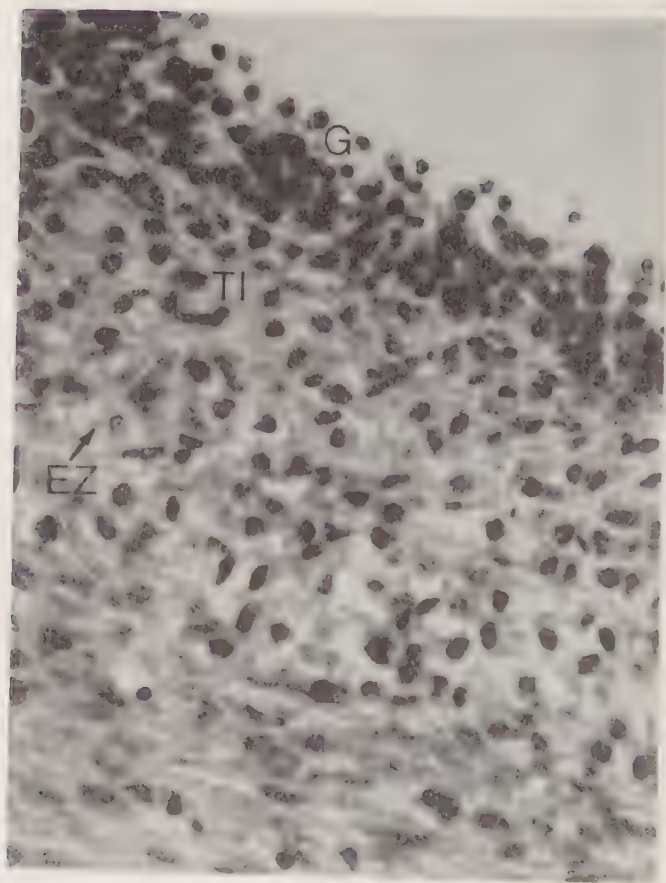


Abb. 14: Präovulatorische Phase. Beginnende Auflockerung der Granulosa (G) und der Theka interna (TI). Auftreten der ersten Epitheloidzellen (EZ) mit aufgehellten Chromatinverteilungen. Masson-Färbung. Vergrößerung 250-fach.

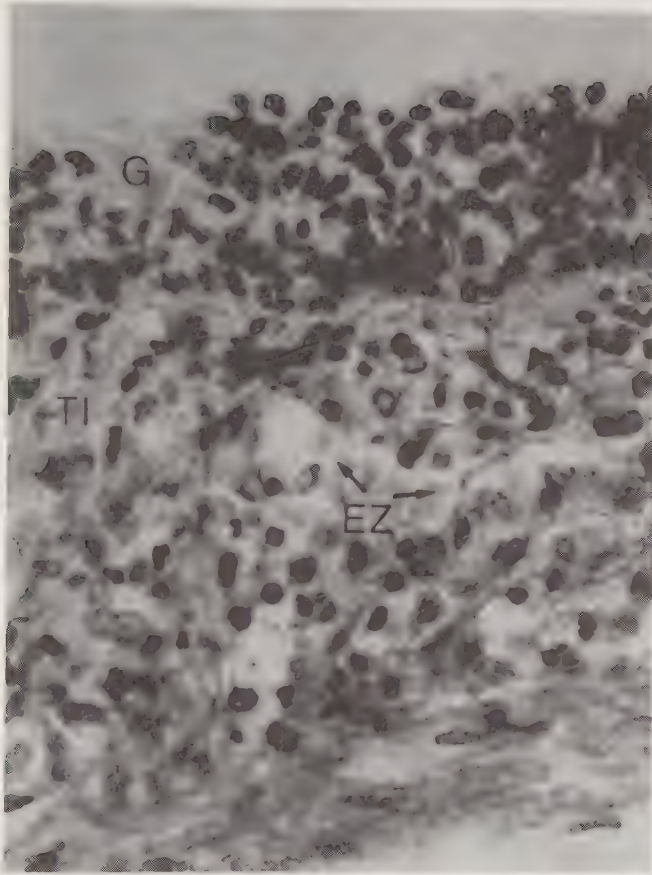


Abb. 15: Ovulatorische Phase. Ein Teil der Theka interna Zellen hat sich in große schaumige Epitheloidzellen (EZ) umgewandelt. Granulosa (G) und Theka interna (TI) sind stark aufgelockert. Masson-Färbung. Vergrößerung 250-fach.



Abb. 16: Ovulatorische Phase. Kurz vor der Ovulation zeigen die Granulosa (G) und die Basalmembran (B) eine leichte Welligkeit. Theka interna (TI), Theka externa (TE) und angrenzende Tunica albuginea (TA). Masson-Färbung. Vergrößerung 125-fach.

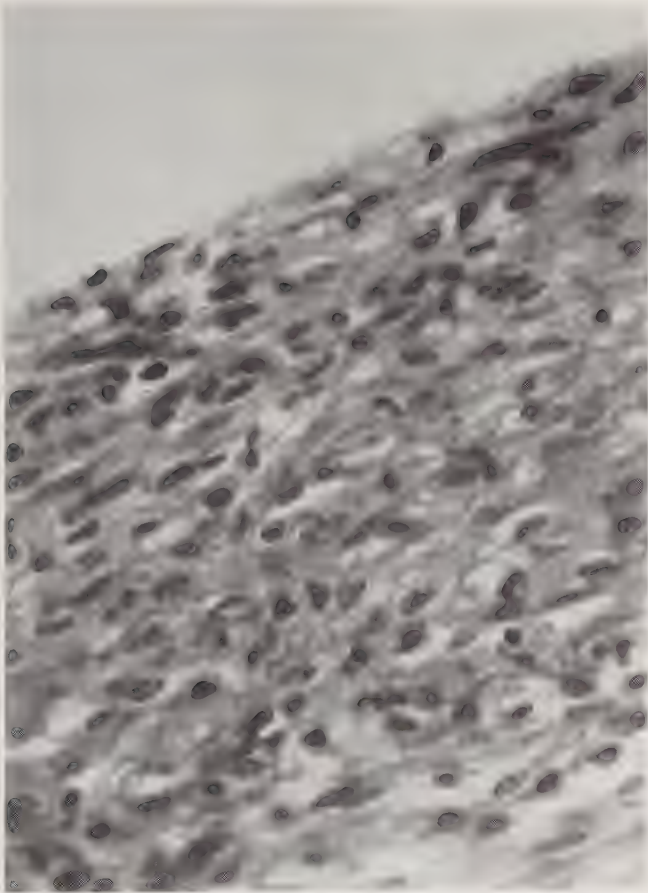


Abb. IVI Atresie von zystischen Typ. Die Granulosa und die Thekaschichten sind nicht mehr zu erkennen. Die Follikelwandung ist zu einer reinen Bindegewebsmembran umgebaut worden. Massive Durchflechtung mit Kollagenfasern. Masson-Färbung. 250-fach.



Abb. 18: Sonderform der zystischen Atresie. In der Follikelwandung haben sich abgegrenzte Luteinzellnester gebildet. Die Granulosa ist völlig atrophiert. Tunica albuginea (TA). Masson-Färbung. Vergrößerung 25-fach.

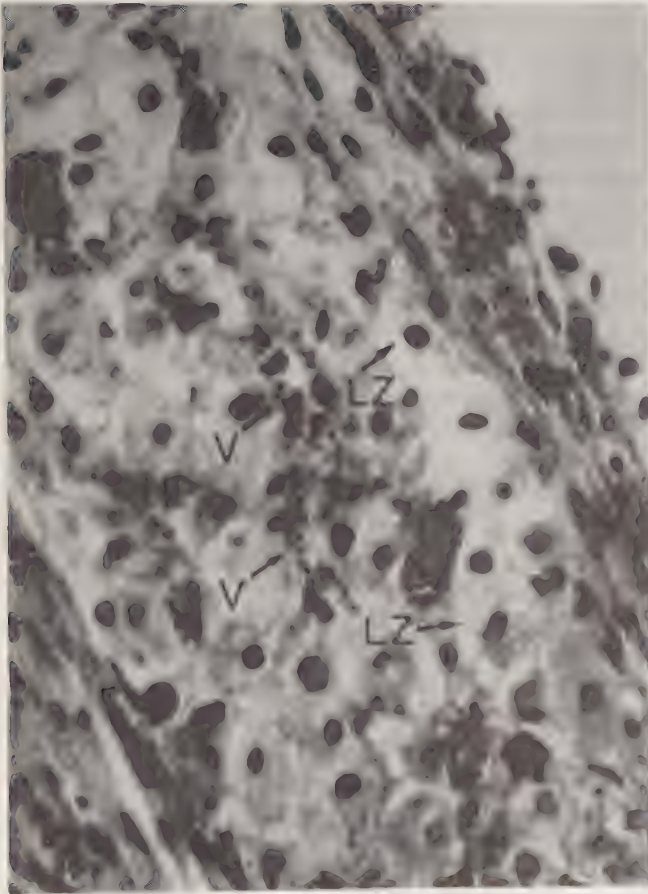


Abb. 19) Ausschnittsvergrößerung von dem Luteinzellnest in Abb. 18. Große Luteinzellen (LZ) mit hellem Zytoplasma liegen eng aneinander. Zahlreiche Blutgefäße (V) durchdringen den Zellverband. Masson-Färbung. Vergrößerung 250-fach.

2.2. Die Abhängigkeit der Kontraktionskraft vom Volumen und Entwicklungsstadium des Follikels

In dieser Versuchsreihe wurden 159 Follikelhautstreifen von 79 Follikeln von 58 verschiedenen Ovarien durchgemessen. In allen Fällen betrug die Histamintestkonzentration $100 \mu\text{g/ml}$ und die Vorlast 1000 mg. Von den beiden Hautstreifen eines Follikels wurde jeweils der mit der größeren Kontraktionsamplitude in die Auswertung miteinbezogen.

Das Follikelvolumen variierte von 0,5 ml bis 63,0 ml. Die Volumina von 0,5 ml bis 20,0 ml waren in der Untersuchung ungefähr in der gleichen Häufigkeit vertreten. Nur die größten, zystisch veränderten Follikel hatten am Untersuchungsgut einen geringeren Anteil.

Abb. 20 zeigt die Gesamtübersicht über das Kontraktionsverhalten der Follikel. Die Follikel sind nach ihrem Volumen und ihrer Kontraktionskraft eingetragen. Ihr klassifiziertes Entwicklungsstadium ist mit Symbolen gekennzeichnet.

In der früh- und zwischenovulatorischen Phase befanden sich 17 Follikel mit den Volumina von 0,5 ml bis 18,5 ml, wobei jedoch die meisten im kleineren Volumenbereich von 0,5 ml bis 5,0 ml lagen und nur 3 Follikel mit größerem Volumen (9,5 ml, 14,5 ml, 18,5 ml) außerhalb dieses Bereichs fielen. Die Kontraktionsamplituden bewegten sich zwischen 35 Skt und 145 Skt. Zwei Follikel mit den niedrigsten Kontraktionsstärken zeigten jedoch bereits Anzeichen von regressiven Veränderungen in Richtung Atresie (1,6 ml, 3,5 ml), zudem auch ein Follikel (1,8 ml) mit einer grös-

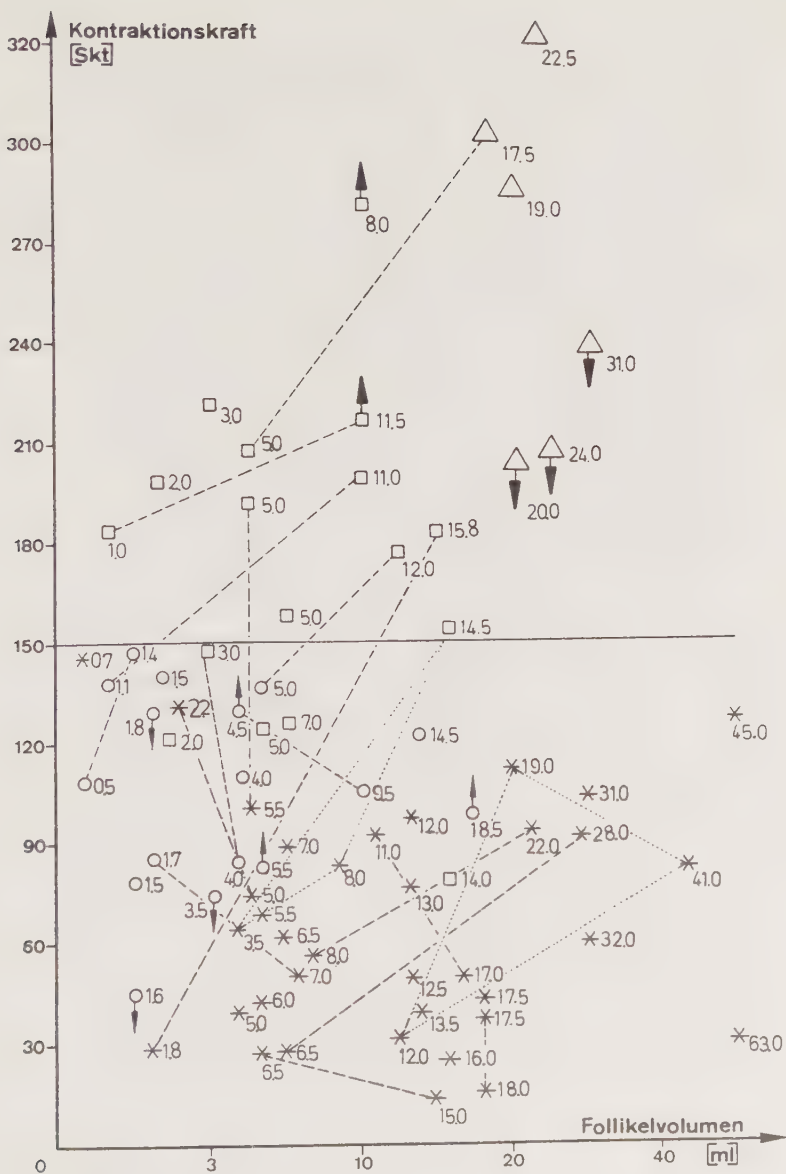


Abb. 20

seren Kontraktionskraft. Bei drei Follikeln (4,5 ml, 5,5 ml, 18,5 ml) waren im histologischen Schnitt Tendenzen der Reifung zum sprungreifen Follikel zu erkennen, sie waren aber nicht eindeutig in die Gruppe der präovulatorischen Follikel einzuordnen.

Follikel in der präovulatorischen Phase wurden in 18 Fällen differenziert. Ihre Volumina lagen insgesamt im Bereich von 1,0 ml bis 18,5 ml. In der Übersicht streuen ihre Kontraktionsamplituden weiter als die der früh- und zwischenovulatorischen Follikel. Die Kontraktionswerte lagen in der Größenordnung von 79 Skt bis 281 Skt. Bereits kleinere Follikel (1,0 ml - 3,0 ml) zeigten schon präovulatorische Veränderungen. Zwei Follikel (8,0 ml, 11,5 ml) befanden sich in ihrer Entwicklung auf dem Weg zur ovulatorischen Phase und wiesen hohe Kontraktionsamplituden (220 Skt,

Zu Abb. 20: Die Abhängigkeit der Kontraktionsamplitude vom Volumen und Entwicklungsstadium des Follikels.

Zeichenerklärung:

○ früh- und zwischenovulatorische Phase

□ präovulatorische Phase

△ ovulatorische Phase

* atretische Stadien



Tendenz zur Atresie



Follikel mit der Tendenz zum folgenden Entwicklungsstadium

- - - Verbindungslinien kennzeichnen Follikel eines Ovars

281 Skt). Lediglich ein Follikel mit dem Volumen von 14,0 ml reagierte im Verhältnis zu allen anderen Follikeln der Gruppe mit einer geringen Kontraktion.

Follikel in einer ausgeprägten ovulatorischen Phase waren in der Untersuchung mit sechs Exemplaren relativ unterrepräsentiert, da die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines ovulatorischen Follikels im Untersuchungsgut unter 0,05 lag und diese makroskopisch nicht zu selektieren waren. Das Volumen der Follikel bewegte sich im Bereich von 17,5 ml bis 31,0 ml und war damit deutlich höher als das der früh- und präovulatorischen Follikel.

Diese Follikel wiesen auch mit Abstand die höchsten Kontraktionswerte unter allen Follikeln auf. Die Kontraktionswerte variierten von 195 Skt bis 320 Skt. Drei Follikel der Gruppe (20,0 ml, 24,0 ml, 31,0 ml) zeigten bereits schon wieder diskrete Anzeichen der Atresie und lagen mit ihren Kontraktionsstärken von 195 Skt bis 235 Skt um einiges tiefer als Follikel im Höhepunkt der ovulatorischen Phase, die mit ihren Kontraktionsamplituden von 283 Skt, 300 Skt und 320 Skt die absolut höchsten Werte erreichten. Das Volumen dieser ovulatorischen Follikel lag relativ eng begrenzt um die 20 ml.

In allen Volumenbereichen von 0,7 ml bis 63,0 ml konnten atretische Follikel gefunden werden. Bei den größeren Follikeln (20 ml - 60 ml) war die Atresie vom zystischen Typ vorherrschend, ein Teil davon zeigte eine örtliche oder eine vollständige Luteinisierung der Theka interna. Die atretischen Follikel hatten im Vergleich zu allen

anderen Entwicklungsphasen die niedrigsten Kontraktionsamplituden (15 Skt - 145 Skt). Dabei zeigten zwei kleine atretische Follikel (0,7 ml, 2,2 ml) ebenso große Kontraktionswerte (145 Skt, 131 Skt) wie Follikel der früh- und zwischenovulatorischen Phase.

In 17 Fällen wurden zwei Follikel desselben Ovars, in zwei Fällen drei Follikel eines Ovars zur Messung herangezogen. Bei einem der Drei-Follikel-Ovarien waren alle Follikel atretisch (19,0 ml, 12,0 ml, 41,0 ml). Bei dem zweiten Drei-Follikel-Ovar waren zwei Follikel (3,5 ml, 8,0 ml) atretisch, ein Follikel (14,5 ml) jedoch befand sich in der präovulatorischen Phase und kontrahierte sich annähernd doppelt so stark wie die atretischen Follikel. Unter den 17 Zwei-Follikel-Ovarien waren sieben mit jeweils zwei atretischen Follikeln.

Zwei Ovarien besaßen sowohl einen atretischen Follikel (1,8 ml, 5,5 ml) als auch einen Follikel in der präovulatorischen Phase (15,8 ml, 5,0 ml) und ein Ovar enthielt einen atretischen Follikel (7,0 ml) und einen in der Frühphase (1,7 ml). Die Kontraktionswerte der reifenden Follikel waren mehr als doppelt so hoch wie der entsprechende atretische Follikel.

Weitere zwei Ovarien trugen jeweils zwei Follikel in der Frühphase (1,4 ml, 0,5 ml und 9,5 ml, 4,5 ml), deren Kontraktionsamplituden sich nur geringfügig unterschieden. Dagegen zeigten sich bei zwei Ovarien zwischen den Follikeln in der präovulatorischen Phase (11,0 ml, 12,0 ml) und den Follikeln in der Frühphase (1,1 ml, 5,0 ml) bedeutende Kontraktionsunterschiede.

Die Kontraktionen zwischen zwei Follikeln eines Ovars in der präovulatorischen Phase (11,5 ml, 1,0 ml) waren mäßig unterschiedlich. Dagegen zeigte sich bei einem Ovar eine größere Kontraktionsdifferenz zwischen einem ovulatorischen Follikel (17,5 ml) und einem präovulatorischen Follikel (5,0 ml).

Keiner der Follikel in der früh- und zwischen-ovulatorischen Phase und kein atretischer Follikel erreichte Kontraktionswerte von über 150 Skt. Nur wenige der präovulatorischen Follikel, hauptsächlich die mit kleineren Volumina, und kein ovulatorischer Follikel lagen unter dieser Marke.

2.3. Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse

Die Gegenüberstellung der durchschnittlichen Kontraktionsamplituden für die in Entwicklungsstadien klassifizierten Follikel zeigt die Abb. 21. Dabei stellt sich ein ausgeprägter Anstieg der mittleren Kontraktionsamplitude von der früh- und zwischen-ovulatorischen Phase zur präovulatorischen Phase und noch ein größerer Anstieg zur ovulatorischen Phase dar. Der Durchschnittswert für die atretischen Follikel liegt weit unter den Werten der Reifungsstadien. Zusätzlich zum jeweiligen Mittelwert wurde in Abb. 21 die Standardabweichung ($\pm$ SEM) angegeben, um einen Überblick über die Streubreite der Meßwerte zu geben.

Für eine statistische Überprüfung der Mittelwerte und zur Darstellung der statistischen Aussagefähigkeit der klassifizierten Meßwerte wurde

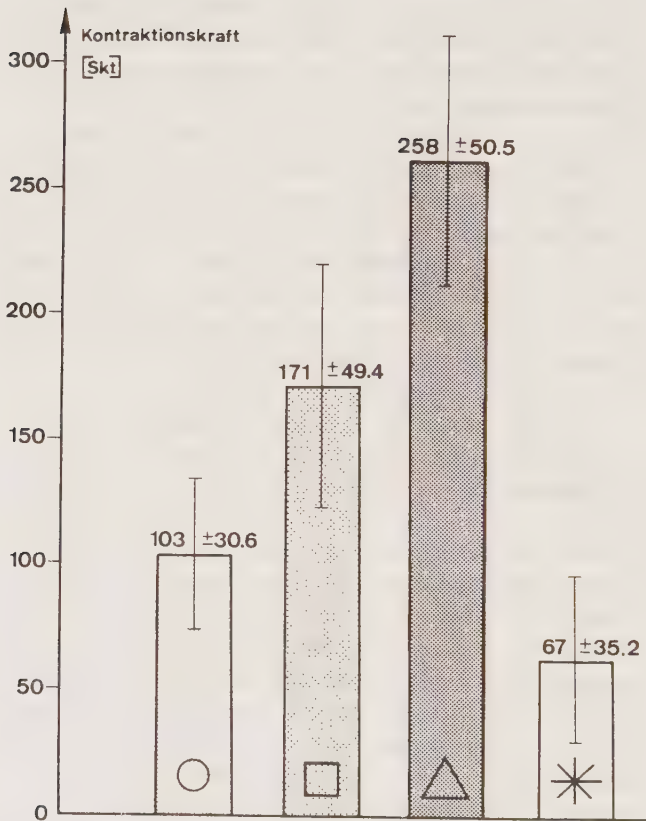


Abb. 21: Die durchschnittlichen Kontraktionsamplituden der klassifizierten Entwicklungsstadien. (Zeichenerklärung vgl. Abb. 20).

der Wilcoxon-Zwei-Stichproben-Test (Rangsummentest) für unverbundene Stichproben (80) nach den

exakten Schranken von Wabeke und Van Eeden (75) herangezogen. Es wurde das Verhältnis der Kontraktionsamplituden der Klassifikationen auf Signifikanz geprüft.

Die Unterschiede der Kontraktionsamplituden der verschiedenen Klassifikationen untereinander erwiesen sich mit folgender Irrtumswahrscheinlichkeit p als signifikant:

1. Die Kontraktionswerte der
früh- und zwischenovulatorischen
Phase von der präovulatorischen
Phase $p \leq 0,01$
2. Die Kontraktionswerte der
präovulatorischen Phase von der
ovulatorischen Phase $p \leq 0,01$
3. Die Kontraktionswerte der
atretischen Phase von der
früh- und zwischenovulatorischen
Phase $p \leq 0,01$

Damit sind die Kontraktionsunterschiede zwischen allen Klassifikationen der Entwicklungsstadien auf dem 99 % - Niveau als signifikant anzusehen.

2.4. Ergebnisse aus der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Follikelhautstreifen

In der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung der Follikelhautstreifen wurden die früh- und zwischenovulatorische Phase, die prä-ovulatorische und ovulatorische Phase als auch atretisch veränderte Follikel nach den morphologischen Grundlagen der Kontraktionsfähigkeit untersucht.

Die Proben wurden direkt neben den Präparaten für die lichtmikroskopische Untersuchung aus den Follikelhautstreifen gewonnen und nach dem in II.5.2. angegebenen Verfahren weiterverarbeitet.

Der Tunica albuginea galt dabei das besondere Interesse der Untersuchung, da in ihr als der weitaus dicksten Schicht der Follikelwandung die für die Kraftentwicklung verantwortlichen kontraktile Strukturen vermutet wurden.

Nach Somlyo und Somlyo (66) gelten als elektronenmikroskopische Kriterien der glatten Muskelzelle:

1. Myofilamente im Zytoplasma
2. Elektronendichte Strukturen an den Filamenten
3. Mikropinozytotische Vesikel im Bereich der zytoplasmatischen Membran
4. Lokalisation von Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum um den Kern

In allen Entwicklungsstadien fanden sich in der Tunica albuginea in einem Netzwerk von kompakten Kollagenfaserbündeln neben Fibroblasten deutlich abgrenzbar Zellen besonderer Struktur.

Das Zytoplasma dieser länglichen Zellen ist im Vergleich zu dem der Fibroblasten dichter strukturiert. Ihre Zellkerne weisen eine mehr langgezogene Form auf (Abb. 22). In einer Ausschnittsvergrößerung zeigen sich im Zytoplasma fibrilläre Strukturen, die in Längsrichtung der Zelle angeordnet sind (Abb. 24). Innerhalb dieser Filamente prägen sich in einer unregelmäßigen Verteilung spindelförmige Verdichtungen unterschiedlichen Grades und Größe aus. In Kernnähe gruppieren sich zahlreiche Zellorganellen (Abb. 23).

Diese in der gesamten Tunica albuginea vorhandenen fibroblastenähnlichen Zellen zeigen damit einige Charakteristika der glatten Muskelzelle und lassen sich daher als fibroblastenähnliche Zellen mit myofibrillären Strukturen bezeichnen.

Als Vergleich sollen glatte Muskelzellen von einem intraovariellen Blutgefäß dienen. Neben den sowohl in den fibroblastenähnlichen Zellen als auch in der glatten Gefäßmuskulatur erkennbaren Strukturen wie Fibrillen und Verdichtungen ist die glatte Muskelzelle jedoch von einer Membran umhüllt, der sogenannten Basalmembran (Abb. 25). Um die fibroblastenähnlichen Zellen läßt sich keine derartige Membran finden.

In der früh- und zwischenovulatorischen Phase sind die myofibrillären Strukturen vergleichsweise spärlich vorhanden. Viele Kollagenfaserbündel durchziehen netzartig das Gewebe. Auffallend ist auch die Tatsache, daß manche Fibroblasten als Doppelzelle mit unterschiedlich dichtem Zytoplasma vorliegen (Abb. 22).

In der präovulatorischen Phase nehmen die fibrillären Strukturen flächenmäßig deutlich zu. Es

ist aber weniger eine Vermehrung der fibroblasten-ähnlichen Zellen im Gewebe zu beobachten, als mehr eine Größenzunahme dieser Zellen mit einer Zunahme der fibrillären Strukturen (Abb. 23, 24).

In der atretischen Follikelwand dagegen findet sich eine enorme Vermehrung der kollagenen Faserbündel. Fibrilläre Elemente und fibroblastenähnliche Zellen lassen sich kaum mehr finden (Abb. 26). Im Zytoplasma der Fibroblasten hat sich ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum entwickelt (Abb. 27).

Besonders während der präovulatorischen und ovulatorischen Phase finden sich in der Tunica albuginea relativ häufig noch weitere Zellen mit auffallender Struktur (Abb. 28). Die vergleichsweise großen, rundlichen Zellen mit einem runden, manchmal etwas exzentrisch liegenden Kern enthalten in ihrer Peripherie in der Nähe der Zellmembran zahlreiche Granula. Diese Granula haben eine homogene, stark elektronendichte Struktur. Nach Bucher (8) kann man diesen Zelltypus als Mastzelle identifizieren.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Follikelwandung hat gezeigt, daß in der Tunica albuginea neben Fibroblasten fibroblastenähnliche Zellen mit myofibrillären Strukturen existieren. Die Anzahl der myofibrillären Elemente nimmt im Zuge der Reifung von der Frühphase bis zum Zeitpunkt der Ovulation deutlich zu. In atretischen Follikeln sind Zellen mit myofibrillären Elementen kaum mehr zu finden.



Abb. 22: Ausschnitt aus der Tunica albuginea in der frühovulatorischen Phase. Neben Fibroblasten (F), manchmal als Doppelzelle ausgebildet, lassen sich fibroblastenähnliche Zellen mit myofibrillären Strukturen (M) erkennen. Kollagenfaserbündel (K). Vergrößerung 4000-fach.

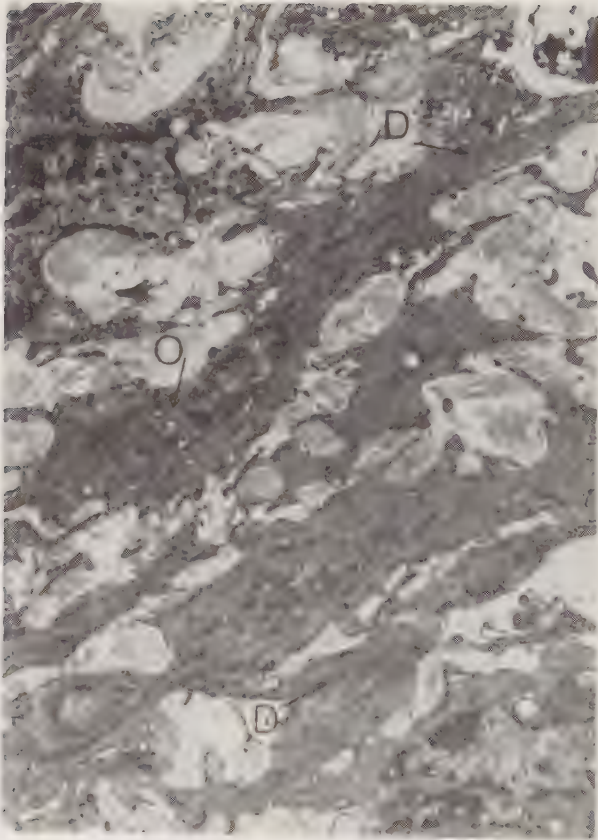


Abb. 23: Zunahme der Myofilamente in der präovulatorischen und ovulatorischen Phase. Innerhalb der filamentären Struktur finden sich Verdichtungen (D). Um den Zellkern angeordnete Zellorganellen (O). Vergrößerung 6000-fach.



Abb. 24: Ausschnittsvergrößerung der fibrillären Elemente. Innerhalb der fibrillären Struktur sind die spindelförmigen Verdichtungen (D) zu erkennen. Vergrößerung 10 000-fach.

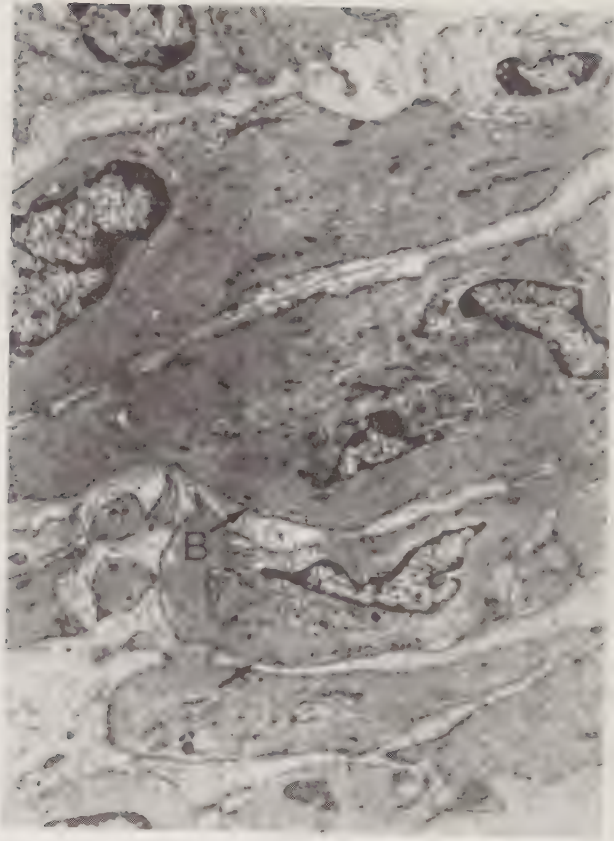


Abb. 25: Glatte Gefäßmuskulatur aus einem intra-ovariellen Blutgefäß. Vergleiche die intrazytoplasmatischen Myofibrillen und Verdichtungen mit Abb. 24. Die für glatte Muskulatur charakteristische Basalmembran (B). Vergrößerung 6000-fach.



Abb. 26: Atretischer Follikel. Starke Zunahme der kollagenen Fasern (K) in der Tunica albuginea. Fibroblasten (F). Vergrößerung 1000x.

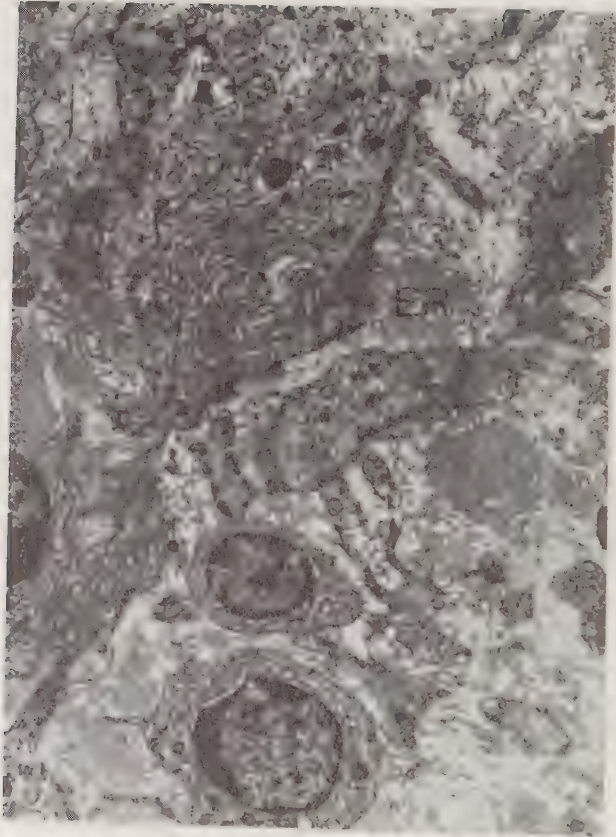


Abb. 27: Ausschnittsvergrößerung aus einem atretisch veränderten Follikel. In den Fibroblasten findet man ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum (ER).
Vergrößerung 10 000-fach.

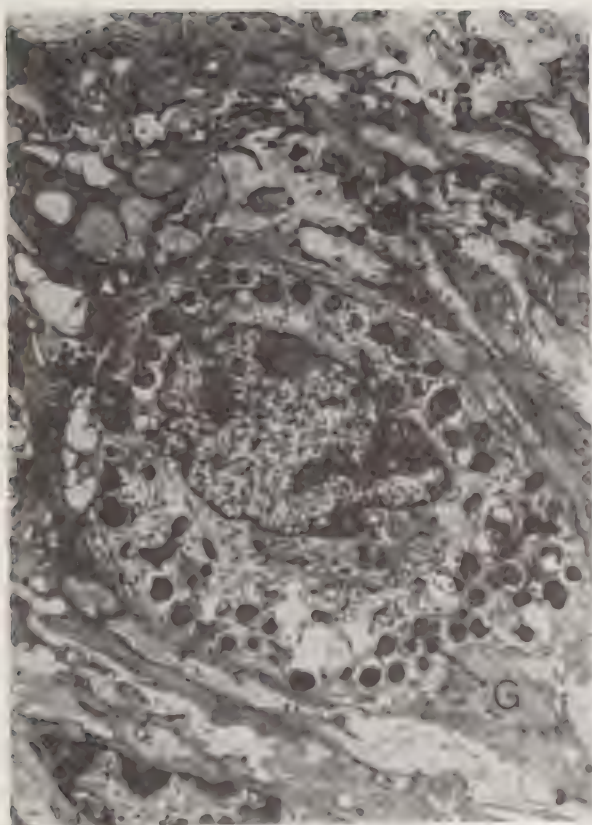


Abb. 28: Mastzelle in der Tunica albuginea.
Homogene elektronendichte Granula (G) in
der Peripherie der Zelle.
Vergrößerung 6000-fach.

DISKUSSION

1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieser Versuchsreihe sollte sein, die Kontraktilität der Follikelwand in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungsstand zu untersuchen. Dazu wurden insgesamt 213 Follikelhautstreifen von 106 Follikeln von 69 verschiedenen Ovarien des Rindes durchgemessen. Zur Induktion der Kontraktionen wurde das Gewebshormon Histamin verwendet. Alle Follikelhautstreifen reagierten ohne Ausnahme auf die Histaminzugabe mit einer mehr oder weniger starken Kontraktion.

Die Follikelwand ist auf Grund ihres Aufbaus und ihrer relativ schnellen Strukturänderung während der Reifungsphase ein biologisches Material, das physikalischen Untersuchungsmethoden wie in diesem Fall der isometrischen Kontraktionsmessung durch die überaus große Vielfalt der Versuchsvariablen Unsicherheiten in der Meßmethode und andere erhebliche Schwierigkeiten bereitet. Einmal müssen die physiologischen Lebensbedingungen für solche aktiven Prozesse wie die Kontraktion annähernd optimal nachgebildet werden. Andererseits müssen die Versuchsbedingungen und das Untersuchungsobjekt Follikelhautstreifen standardisiert werden, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können - zwei nicht zu vereinende, diametral verschiedene Forderungen.

Die Versuchsbedingungen wurden bei dieser Untersuchung so gewählt, daß trotz der schwierigen Voraussetzungen vergleichbare Resultate zu erwarten waren. Dazu gehörten die Voruntersuchungen

über die für die Kontraktionsmessung notwendige optimale Vorlast und die Auswahl einer geeigneten Histamintestdosis. Als standardisierte Werte wurden für die Messungen die Vorlast auf 1000 mg und die Histaminkonzentration auf 100 $\mu\text{g/ml}$ festgesetzt. Die Abmessungen des Untersuchungsobjekts Follikelhautstreifen wurden durch besondere Präparationsmaßnahmen so weit wie möglich konstant gehalten.

Die gemessenen Follikelhautstreifen wurden unter dem Lichtmikroskop nach vorher festgesetzten histologischen Kriterien und ohne Kenntnis ihrer Kontraktionsfähigkeit in vier verschiedene Entwicklungsstadien eingeteilt: Die früh- und zwischenovulatorische Phase bis zum 17. Tag des Reifungszyklus, die präovulatorische Phase vom 18. bis zum 20. Tag, die ovulatorische Phase am 21. Tag und verschiedene degenerative Veränderungen in das Stadium der Atresie. Die Kontraktionsamplituden der Entwicklungsstadien wurden untereinander verglichen und gleichzeitig in Beziehung zum Follikelvolumen gesetzt. Dabei ergaben sich hochsignifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$) zwischen den mittleren Kontraktionsamplituden der Entwicklungsstadien. Bei den Abmessungen der Follikelhautstreifen mit 3 mm Breite und 10 mm Länge ergaben sich folgende durchschnittliche Kontraktionswerte: Die Werte stiegen von der früh- und zwischenovulatorischen Phase ($103 \text{ Skt} \pm 30,6 = 473 \text{ mp} \pm 140,8$) über die präovulatorische Phase ($171 \text{ Skt} \pm 49,4 = 786 \text{ mp} \pm 227,3$) zur ovulatorischen Phase ($258 \text{ Skt} \pm 50,5 = 1187 \text{ mp} \pm 223,3$) auf das zweieinhalbfache an. Die Kontraktionskraft atretischer Follikel ($67 \text{ Skt} \pm 35,2 = 308 \text{ mp} \pm$

161,9) lag weit unter der reifender Follikel.

Das Reifestadium zeigte jedoch keine so strenge Abhängigkeit vom Follikelvolumen. Kleinere Follikel befanden sich manchmal schon in fortgeschrittenen Phasen, während größere Follikel sich ab und zu noch in der Frühphase aufhielten (vgl. Abb. 20). Die Volumina der ovulatorischen Follikel lagen im näheren Bereich um 20 ml. Atretische Follikel waren in allen Volumenbereichen von 0,7 ml bis 63 ml vertreten.

In den lichtmikroskopischen Untersuchungen zur Stadieneinteilung der Follikelhautstreifen wurde auch gleichzeitig nach kontraktionsfähigen Zellen in der Follikelwand gesucht. Aber sowohl in der Theka interna und Theka externa als auch in der gesamten Tunica albuginea ließen sich mit der Hämatoxylin- und Massonfärbung keine glatten Muskelzellen identifizieren. Nur die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, insbesondere in der Theka externa, waren abgrenzbar.

Dagegen ließen sich in Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop ohne größere Schwierigkeiten in der Tunica albuginea fibrilläre Strukturen im Zytoplasma fibroblastenähnlicher Zellen erkennen. Diese fibrillären Elemente mit ihren unregelmäßigen Verdichtungen gleichen den fibrillären Strukturen in glatten Muskelzellen, z.B. den in Gefäßwänden. Im Gegensatz zu diesen Zellen besitzen die fibroblastenähnlichen Zellen keine Basalmembran.

Parallel mit der Reifung der Follikel und der Zunahme der Kontraktilität nahm auch der flächenmäßige Anteil der fibrillären Strukturen zu, und zwar im wesentlichen über eine Vergrößerung der

fibroblastenähnlichen Zellen. Ebenso sind in atretischen Follikeln kaum mehr kontraktile Strukturen zu erkennen, entsprechend der Abnahme ihrer Kontraktionsfähigkeit.

In der Tunica albuginea konnten besonders häufig bei ovulatorischen Follikeln große, rundliche Zellen mit peripheren elektronendichten Granula gefunden werden, die nach elektronenmikroskopischen Kriterien als Mastzellen zu bezeichnen sind.

2. Wertung der Ergebnisse

In welchen Rahmen können die gemessenen Kontraktionskräfte eingeordnet werden? Welche physikalische Auswirkung und in welcher Größenordnung mögen sie auf die Wandspannung der Follikelhaut haben? Dies soll im Folgenden in einer hypothetischen Betrachtung abgeschätzt werden. In welchem Maße steigt die Wandspannung, wenn sich zu der durch den Follikelinnendruck bewirkten statischen Wandspannung eine zusätzliche, durch Kontraktion induzierte, addiert? In welchem Verhältnis stehen die Wandspannungen zueinander?

Die Follikelwand steht durch den Innendruck p der Follikelflüssigkeit unter einer Spannung S (vgl. II.1.4.), deren Größe außerdem noch vom Innenradius r und der Wandstärke w des Follikels abhängt. Allein durch das Follikelwachstum steigt die Wandspannung über die Zunahme des Radius an. Zudem verdünnt sich die Wandstärke mit der Annäherung an den Ovulationszeitpunkt (22), was zu einem weiteren Anwachsen der Wandspannung führt.

Die Wandspannung ist ein Maß für die Belastung

der Wand. Zusätzliche Kräfteinwirkungen beeinflussen die Wandspannung. Erst wenn die Belastbarkeit der Follikelhaut in einem Bereich überschritten wird, kommt es zum Einriß und damit zur Ovulation.

Beispiel:

Vorausgesetzt wird ein konstanter Follikelinnen-
druck von 10 mmHg (16).

Die Wandspannung des Follikels beträgt (vgl. II.1.
4.):

$$S = \frac{p \cdot r}{2 \cdot w}$$

Der Innendruck beträgt 10 mmHg $\hat{=}$ 0,136 p/mm² H₂O.

Das Follikelvolumen sei für einen ovulatorischen
Follikel 20 ml (vgl. III.2.2.).

Der Innenradius beträgt dann 17 mm.

Die Wandstärke w des Follikels ist nicht bekannt.

Damit ergibt sich für die Wandspannung S der Wert:

$$S = \frac{0,136 \cdot p \cdot 17 \text{ mm}}{2 \cdot w \cdot \text{mm}} = \frac{1,16 \text{ p}}{w \cdot \text{mm}} \quad (1^*)$$

Der Follikelhautstreifen unterlag während des
Schneidevorgangs den gleichen physiologischen Be-
dingungen wie die übrige Follikelwand (vgl. II.3.
2.). Seine Wandstärke ist deshalb ebenso groß wie
die des Follikels und nicht genau bekannt.

Die Breite b des Follikelhautstreifens beträgt
konstant 3 mm. Damit ist der Querschnitt des Strei-
fens 3 · w · mm. K ist die gemessene Kraft. Die durch
Kontraktion erzeugte Spannung S beträgt:

$$S = \frac{K}{q} = \frac{K}{b \cdot w}$$

Durch Eichung der Meßvorrichtung wurden für die relativen Kontraktionswerte folgender Umrechnungsfaktor bestimmt:

$$1 \text{ Skt} \hat{=} 4,6 \text{ mp}$$

Eine starke Kontraktion mit 320 Skt entspricht damit einer Kraft von 1,5 p.

Es ergibt sich damit für den Follikelhautstreifen eine erzeugte Spannung von:

$$S = \frac{1,5 \text{ p}}{3 \cdot w \cdot \text{mm}} = \frac{0,5 \text{ p}}{w \cdot \text{mm}} \quad (2^*)$$

Obwohl die Wandstärke des Follikels nicht bekannt ist, lassen sich statische Wandspannung (1^*) und die im Follikelhautstreifen durch Kontraktion erzeugte Spannung (2^*) vergleichen und ihr Größenverhältnis errechnen.

$$\frac{S(2^*)}{S(1^*)} = \frac{0,5 \cdot p \cdot w \cdot \text{mm}}{1,16 \cdot p \cdot w \cdot \text{mm}} = \frac{0,5}{1,16} = 43 \%$$

In diesem gewählten Beispiel steigt durch eine Kontraktion die Wandspannung des Follikels um 43 %.

Fällt jedoch zusätzlich der Follikelinnendruck zum Zeitpunkt der Ovulation (16), so erhöht sich im Verhältnis zur Wandspannung der durch die Kontraktion erzeugte Spannungsanteil.

Der hypothetische Verlauf der Wandspannung wurde für einen Follikel während der Reifung bis

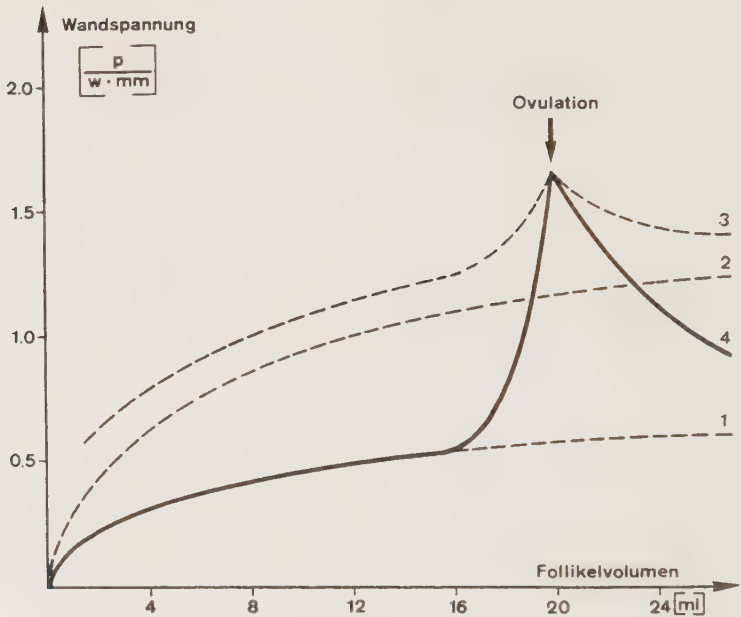


Abb. 29: Der hypothetisch errechnete Verlauf der Wandspannung währen der Follikelreifung in Abhängigkeit vom Follikelvolumen.

zur Ovulation errechnet, unter Einbeziehung der Volumenzunahme, der Abnahme der Wandstärke und der Zunahme der Kontraktilität.

Abb. 29 zeigt den resultierenden Verlauf der Wandspannung. Kurve 1 beschreibt die Wandspannung des Follikels in Abhängigkeit von seinem Volumen bei konstanter Wandstärke. Da der Radius wesentlich langsamer ansteigt als das Volumen, wächst

die Wandspannung mit zunehmenden Volumen immer langsamer. Kurve 2 beschreibt den Wandspannungsverlauf unter den gleichen Verhältnissen wie in Kurve 1, jedoch für einen Follikel mit einer auf die Hälfte reduzierten Wandstärke. Kurve 3 kennzeichnet den möglichen Wandspannungszuwachs durch die gemessenen Kontraktionswerte für die verschiedenen Follikelgrößen in Bezug zur Kurve 2.

Während der Follikelreifung nimmt nicht nur das Volumen zu, sondern die Fibroblastenschichten in der Tunica albuginea und damit auch die Wandstärke nehmen in Annäherung an den Ovulationszeitpunkt auf ein Fünftel der ursprünglichen Dicke ab (22). In Abb. 29 wurde lediglich eine Abnahme der Wandstärke um die Hälfte zu Grunde gelegt. Die für den Verlauf der Follikelreifung resultierende Wandspannung demonstriert Kurve 4. Sie klettert durch die Dickenabnahme der Wand von Kurve 1 in Richtung Kurve 2. Dazu addiert sich die durch Kontraktion erzeugte Wandspannung, die zum Zeitpunkt der Ovulation ebenfalls zunimmt.

Nach dem Zeitpunkt der Ovulation sinkt die Kontraktionsfähigkeit der Follikelhaut wieder und deren Wandstärke nimmt im Laufe atretischer Veränderungen zu. Insgesamt verringert sich die Wandspannung nach Überschreiten des Ovulationszeitpunktes.

Berücksichtigt man die durch die Versuchsbedingungen und Standardisierungen sicher nicht optimalen Kontraktionsbedingungen, so erscheinen größere Kontraktionsamplituden in vivo als durchaus vorstellbar.

Kontraktionen, die im Vergleich zur statischen Wandspannung in den berechneten Größenordnungen

liegen, lassen eine Beeinflussung des Ovulationsvorganges möglich erscheinen. Rondell (62) hat in seinen Untersuchungen eine große Empfindlichkeit des ovulatorischen Follikels gegenüber einer relativ geringen Belastung durch eine kleine Volumenerhöhung festgestellt und dadurch die Ovulation auszulösen vermocht, was bei nicht-ovulatorischen Follikeln selbst mit immensen Druckerhöhungen nicht möglich war. In reifen Follikeln genügte eine Drucksteigerung von 10 mmHg auf 15 mmHg zur Ovulationsauslösung.

Auch sind Ovulationen nach Zugabe von kontrahierenden Substanzen wie PF_{2a} , Noradrenalin und Oxytocin in intraovarielle Blutgefäße bei reifen Follikeln in vivo beobachtet worden (74). So erscheint es denkbar, daß durch die Kontraktionen (16) bedingten dynamischen Wandspannungsveränderungen, seien sie auch nicht auffällig stark, die Haltbarkeitsschwelle der Follikelmembran an ihrer schwächsten Stelle - dem Stigma (54), einem gefäßlosen, dünnen Bezirk der Follikeloberfläche - überschritten wird und zum Einriß der Membran führt. Über eine Keilwirkung des Membrandefekts weitet sich die Ovulationsöffnung auf etwa 1-2 mm (33).

Ein eigentliches Platzen der Follikelwand findet bei der Ovulation nicht statt, wie es noch Simon (64) durch eine Innendruckerhöhung und Wandverdünnung bedingt vermutete. Vielmehr zeigte sich in Beobachtungen, daß der Follikelinhalt nach dem Durchbruch des Stigmas kontinuierlich über mehrere Minuten ausfließt (4,16). Hierbei ist eine Mitwirkung der Membrankontraktilität denkbar. Über eine isotonische Kontraktion in Verbindung mit einer

Transsudation von Flüssigkeit aus dem Intravasalraum (16) wird der Follikelinhalt mit dem Ei ausgetrieben und eine Retention verhindert.

Die in vivo beobachteten Kontraktionen des Ovars treten jedoch nicht erst kurz vor der Ovulation auf, sondern sind während des gesamten Zyklus registrierbar. Sie nehmen aber zum Ovulationszeitpunkt hin an Frequenz und Amplitude zu (74). Können die Kontraktionen nicht auf irgendeine Weise an der Disintegration der Follikelwand mitbeteiligt sein? Kurz vor der Ovulation scheinen Mikrovesikel aus Zellen in das Interstitium freigesetzt zu werden, die an der Auflösung der amorphen Zwischenzellsubstanzen in der Tunica albuginea und Theka externa und an der Aufsplitterung der Kollagenfaserbündel beteiligt sein sollen (3, 22). Die einzelnen Kollagenfasern werden dabei aber nicht aufgelöst, sondern ihre $640 \text{ \AA}$ - Periodizität der Feinstruktur bleibt erhalten. Dadurch können die Fasern auseinandergleiten (19) und es resultiert eine Abnahme des Haltegewebes auf ein Viertel bis ein Fünftel. Können die Kontraktionen diesen Prozess über eine Art Pumpwirkung ermöglichen oder unterstützen, indem sie über eine schnelle und gleichmäßige Verteilung die Durchmischung und Weitertransport der lytischen Substanzen fördern? Kann dies ein Sicherheitsmechanismus der Ovulation sein?

Im Laufe der Follikelentwicklung nehmen sowohl der Anteil der fibroblastenähnlichen Zellen zu als auch durch eine Größenzunahme der Zellen selbst die Anzahl ihrer fibrillären Elemente. Es ist anzunehmen, daß sich die myoiden fibroblastenähnlichen Zellen aus Fibroblasten differenzieren. In

atretischen Follikeln und großen Follikelzysten findet man nur wenige Zellen mit kontraktile Strukturen. Einerseits können diese wie auch die anderen wandbildenden Zellen durch degenerative Veränderungen nach Eintreten der Atresie dezimiert und durch Bindegewebe ersetzt worden sein. Andererseits scheint es aber auch möglich, daß durch eine ausgebliebene Differenzierung von Fibroblasten in kontraktile Zellen oder deren fehlende funktionelle Aktivität die reifen Follikel nicht zur Ovulation fähig waren und dann sekundär zystisch degenerierten.

Nach vielen Untersuchungen gilt es als wahrscheinlich, daß das Phänomen der Ovulation nicht allein durch die eine oder andere Ursache bedingt ist, sondern durch ein Zusammenspiel von vielen verschiedenen Vorgängen und Faktoren. Die Ovulation wird daher nicht nur als ein durch hormonelle Einflüsse gesteuerter Auflösungsprozess der Follikelwand zu verstehen sein, sondern die zunehmende, morphologisch und wahrscheinlich auch funktionell bedingte Kontraktilität scheint über ihre physikalischen Einwirkungen auf die Follikelhaut mit ein Mosaikstein im Ovulationsmechanismus zu sein.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Asdell, S.A.: The ovary. Zuckermann, S.,
Academic Press, New York, 435 f., 1962.
2. Barth, H., Naber, K., Niemeyer, I., Bichler,
K.H., Lorenz, W.: Histamin concentration
and histamin methyltransferase activity
of rabbit kidney during experimental
hydronephrosis. Br. J. Surg. 11, S. 918,
1961.
3. Bjersing, L., Cajander, S.: Ovulation and
the role of the ovarian surface epi-
thelium. Experimenta 31, 605-608, 1975.
4. Blandau, R.J., Rumery, R.E.: Measurements
of intrafollicular pressure in ovulatory
and preovulatory follicles in the rat.
Fertil. Steril. 14, 330-341, 1963.
5. Blandau, R.J.: Ovulation. Greenblatt, R.B.,
Lippincott, Philadelphia, S. 3, 1966.
6. Bruce, N.W., Moor, R.M.: Ovarian blood
flow in the sheep. J. Reprod. Fertil. 43,
392-393, 1975.
7. Bülbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W.,
Tonsta, T.: Smooth muscle. Arnold,
London, 1970.
8. Bucher, O.: Zytologie und Histologie des
Menschen. Stuttgart 1977.

9. Burden, H.W.: Ultrastructural observations on ovarian perifollicular smooth muscle in the cat, guinea pig, and rabbit. Amer. J. Anat. 133, 125-131, 1972.
10. Burr, J.H., Davies, J.I.: The vascular system of the rabbit ovary and its relationship to ovulation. Anat. Record 111, 273-292, 1951.
11. Cajander, S.: On the mechanism of ovulation. Umeå University med. Diss. 23, S. 8, 1976.
12. Claesson, L.: Is there any smooth musculature in the wall of the Graafian follicle? Acta Anat. 3, 295-311, 1947.
13. Continho, E.M., Maia, H.S.: The motility of the human ovary. Ex. Med. Int. Congr. Ser. 234, S. 118, 1971a.
14. Continho, E.M., Maia, H.S.: The contractile response of the human uterus, fallopian tubes, and ovary to prostaglandins in vivo. Fertil. Steril. 22, 539-543, 1971b.
15. Continho, E.M., Maia, H.S.: Effects of gonadotrophins on motility of human ovary. Nature, London, New Biol. 235, 93-94, 1972.
16. Espey, L.L., Lipner, H.J.: Measurements of intrafollicular pressures in the rabbit ovary. Amer. J. Physiol. 205, 1067-1072, 1963.

17. Espey, L.L.: The mechanism of mammalian ovulation. Diss. Abstr. 25, 5354, 1967.
18. Espey, L.L., Lipner, H.J.: Enzyme-induced rupture of rabbit Graafian follicle. Amer. J. Physiol. 208, 203-213, 1965.
19. Espey, L.L.: Ultrastructure of the apex of the rabbit Graafian follicle during the ovulatory process. Endocrinology 81, 267-276, 1967.
20. Espey, L.L.: Tenacity of porcine Graafian follicle as it approaches ovulation. Amer. J. Physiol. 212, 1397-1401, 1967.
21. Espey, L.L., Rondell, P.: Collagenolytic activity in the rabbit and sow Graafian follicle during ovulation. Amer. J. Physiol. 214, 326-329, 1968.
22. Espey, L.L.: Decomposition of connective tissue in rabbit ovarian follicles by multivesicular structures of the thecal fibroblasts. Endocrinology 88, 437-444, 1971.
23. Espey, L.L.: Ovarian proteolytic enzymes and ovulation. Biol. Reprod. 10, 216-235, 1974.
24. Espey, L.L.: The distribution of collagenous connective tissue in rat ovarian follicles. Biol. Reprod. 14, 502-506, 1976.

25. Espey, L.L., Coons, P.J.: Factors, which influence ovulatory degradation of rabbit ovarian follicles. Biol. Reprod. 14, 233-245, 1976.
26. Fasseke, E.: Lehrbuch der histologischen Technik. Urban und Schwarzenberg, Stuttgart.
27. Gimeno, M.F., Borda, L.S., Rettori, V., Gimeno, A.L.: In vitro contractile activity of rat and guinea pig ovaries. Effects of oxytocin and electrical stimulation. Acta Physiol. Lat. Am. 23, S. 363, 1973.
28. Gotthardt-Moosbauer, C.: Histaminspiegel und Einfluß von Histamin und Antihistaminika auf Kontraktilität sowie cAMP- und cGMP-Gehalt der isolierten Follikelhaut des Rindes. Diss. Erlangen 1980.
29. Grohe, F.: Ueber den Bau und das Wachstum des menschlichen Eierstocks. Virchows Arch. 26, S. 271, 1863.
30. Guttmacher, M.S., Guttmacher, A.F.: Morphological and physiological studies on the musculature of the mature Graafian follicle of the sow. John Hopkins Hosp. Bull. 32, 394-399, 1921.
31. Hauschild, F.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie. Thieme, Leipzig, 1973.

32. Hisaw, F.L.: Development of the Graafian follicle and ovulation. *Physiol. Rev.* 27, 95-119, 1947.
33. Höflinger, H.: Das Ovar des Rindes in verschiedenen Lebensperioden unter besonderer Berücksichtigung seiner funktionellen Feinstruktur. *Acta Anat., Suppl.* 5, 3-195, 1948.
34. Jacobowitz, D., Wallach, E.E.: Histochemical and chemical studies of the autonomic innervation of the ovary. *Endocrinology* 81, 1132-1139, 1967.
35. Jensen, C.E., Zachariae, F.: Studies on the mechanism of ovulation. Isolation and analysis of acid mucopolysaccharides in bovine follicular fluid. *Acta Endocrinol.* 27, S. 356, 1958.
36. Keidel, W.D.: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie. Thieme, Stuttgart, 1975.
37. Kölliker von, A.: Beiträge zur Kenntnis der glatten Muskeln. *Ztschr. f. Wiss. Zoologie*, 1, S. 30, 1849.
38. Kuschinsky, G., Lüllmann, H.: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Thieme, Stuttgart, 1976.
39. Lipner, H.J., Maxwell, B.A.: Hypothesis concerning the role of follicular contractions in ovulation. *Science*, 131, 1737-1738, 1960.

40. Lipner, H.: Mechanism of mammalian ovulation. Greep, R.O., Astwood, E.B., Handbook of physiology, Vol. 2, Sect. 7, Chapt. 18. Female reproductive system, 409-437. American Physiological Society, Washington, 1973.
41. Lutwak-Mann, C.: Note on the composition of bovine follicular fluid. J. Agricult. Sc. 44, S. 447, 1954.
42. Mattner, P.E., Thorburn, G.D.: Ovarian blood flow in sheep during the oestrous cycle. J. Reprod. Fert. 19, 547-549, 1969.
43. Moor, R.M., Mary, F.H., Seamark, R.F.: The sheep ovary: Regulation of steroidogenic, haemodynamic and structural changes in the largest follicle and adjacent tissue before ovulation. J. Reprod. Fert. 45, 595-604, 1975.
44. Moore, R.T., Mohrmann, D.E., Niswender, G.D.: Variations in blood flow to the ovaries of sheep during the oestrous cycle. Excerpta Medica Int. Congr. Ser. 256. Proc. 4th Int. Congr. Endocrinology, 64-65, 1972.
45. Okamura, H., Virutamasen, P., Wright, K.H., Wallach, E.E.: Ovarian smooth muscle in the human being, rabbit and cat. Amer. J. Obstet. Gynecol. 112, 183-191, 1972.

46. Okamura, H., Okazaki, T., Nakajima, A.:
Effects of neurotransmitters and prostaglandins on human ovarian contractility. *Obstet. Gynecol.* 44, S. 720, 1974.
47. Okamura, H., Okazaki, T., Nakajima, A.:
Effects of electrical stimulation on human ovarian contractility. *Obstet. Gynecol.* 45, S. 557, 1975.
48. O'Shea, J.D.: An electron microscope study of smooth muscle, and its innervation, in the ovary of the rat. *J. Anat.* 106, S. 196, 1970a.
49. O'Shea, J.D.: An ultrastructural study of smooth muscle-like cells in the theca externa of ovarian follicles in the rat. *Anat. Rec.* 167, 127-140, 1970b.
50. O'Shea, J.D.: Smooth muscle-like cells in the theca externa of ovarian follicles in the sheep. *J. Reprod. Fertil.* 24, 283-285, 1971.
51. O'Shea, J.D., Phillips, R.E.: Contractility in vitro of ovarian follicles from sheep, and the effects of drugs. *Biol. Reprod.* 10, 370-379, 1974.
52. Osvaldo-Decima, L.: Smooth muscle in the ovary of the rat and monkey. *J. Ultrastruc. Res.* 30, 218-237, 1970.

53. Palti, Z., Freund, M.: Spontaneous contractions of the human ovary in vitro. J. Reprod. Fertil. 28, 113-115, 1972.
54. Parr, E.L.: Rupture of ovarian follicle. J. Reprod. Fertil. Suppl. 22, S. 1, 1975.
55. Peckham, B., Kiekhof, W.: The movement of tritium-labeled water in the human ovarian follicle. Am. J. Obstet. Gynec. 78, S. 1012, 1959.
56. Petry, G.: Die Proteinarten im Liquor folliculi und ihre Bedeutung für den Follikelsprung. Fermentforschung 17, S. 2, 1943.
57. Pool, W.R., Lipner, H.: Inhibition of ovulation by antibiotics. Endocrinology 79, 858-864, 1966.
58. Friedkalns, J., Weber, A.F.: Ultrastructural studies of the bovine Graafian follicle and corpus luteum. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 91, 554-573, 1968.
59. Friedkalns, J., Weber, A.F., Zemjanis, R.: Qualitative and quantitative morphological studies of the cells of the membrana granulosa, theca interna and corpus luteum of the bovine ovary. Z. Zellforsch. 85, 501-520, 1968.
60. Rocerto, T., Jacobowitz, D., Wallach, E.E.: Observations of spontaneous contractions of the cat ovary in vitro. Endocrinology 84, 1333-1341, 1969.

61. Rondell, P.: Follicular pressure and distensibility in ovulation. *Am. J. Physiol.* 207, 590-594, 1964.
62. Rondell, P.: Biophysical aspects of ovulation. *Biol. Reprod. Suppl.* 2, 64-89, 1970.
63. Sachs, Hugo Elektronik K.G.: Ratschläge für das Arbeiten mit elektrischen Gebern. Isometrische, auxotonische und isotonische Messungen an Muskelpräparaten. 1971.
64. Simon, L.: Rupture of the Graafian follicle. A partly mechanical problem in ovarian physiology. *Acta Obstet. Gynec. scandinav.* 38, S. 690, 1959.
65. Smith, J.T., Ketteringham, R.C.: Rupture of the Graafian follicle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 36, 433-460, 1938.
66. Somlyo, A.P., Somlyo, A.V.. *Pharmacol. Rev.* 20, S. 197, 1968.
67. Szego, C.M.: Role of histamin in mediation of hormone action. *Fedn. Am. Socs. Exp. Biol.* 24, 1343-1352, 1965.
68. Thompson, A.: The ripe human Graafian follicle together with some suggestions as to its mode of rupture. *J. Anat.* 54, S. 1, 1919.

69. Troidl, H., Lorenz, W., Rohde, A., Häfner, G., Ronzheimer, M., Seidel, W.: Histamin concentration in the human gastric mucosa and its relation to pentagastrin stimulated acid secretion. Br. J. Surg. 61, S. 323, 1974.
70. Vilee, C.A.: Control of ovulation. Pergamon, New York, 1961.
71. Virutamasen, P., Wright, K.H., Wallach, E.E.: Effects of catecholamins on ovarian contractility in the rabbit. Obstet. Gynecol. 39, 225-236, 1972a.
72. Virutamasen, P., Wright, K.H., Wallach, E.E.: Effects of prostaglandins E_2 and F_{2a} on ovarian contractility in the rabbit. Fert. Steril. 23, 675-682, 1972b.
73. Virutamasen, P., Wright, K.H., Wallach, E.E.: Monkey ovarian contractility: Its relation to ovulation. Fert. Steril. 24, S. 763, 1973.
74. Virutamasen, P., Smitasiri, M.D., Fuchs, A.R.: Intraovarian pressure changes during ovulation in rabbits. Fert. Steril. 27, S. 188, 1976.
75. Wabeke, Eden van: Handleiding voor de toets van Wilcoxon. Mathematisch Centrum, Statistische Afdeling, Amsterdam, Rapport S. 176, (M65), 1955.

76. Walter, E.: Biomathematik für Mediziner.
Teubner Studienbücher Mathematik,
Stuttgart, 1975.
77. Walton, A., Hammond, J.. J. Exptl. Biol. 6,
S. 190, 1928.
78. Weber, K.L., Groeschel-Stewart, U.: Anti-
body to myosin, the specific visualisation
of myosin containing filaments in non-
muscle cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 71,
4561-4564, 1974.
79. Weiner, S., Wright, K.H., Wallach, E.E.:
The influence of ovarian denervation and
nerve stimulation on ovarian contractions.
J. Amer. Obstet. Gynec. 128, 154-160,
1977.
80. White, C.. Department of Public Health Yale
University, New Haven, Connecticut.
Biometrics 8, S. 23, 1952.
81. Zachariae, F., Jensen, C.E.: Studies on the
mechanism of ovulation. Histochemical
and physicochemical investigations on
genuine follicular fluid. Acta Endocrinol.
27, S. 343, 1958.
82. Zachariae, F.: Acid mucopolysaccharides in
the female genital system and their role
in the mechanism of ovulation. Periodica,
Copenhagen, 11, 1959.

Für die freundliche Stellung des Themas
möchte ich Herrn Professor H. Becker
recht herzlich danken.

Außerdem gilt mein Dank Dr. Tulusan für
die Unterstützung in der Auswertung der
histologischen Präparate und den Mitar-
beitern in der Histologie der Frauenkli-
nik und des pharmakologischen Instituts
für ihre bereitwillige Hilfestellung.

LEBENS LAUF

Am 24.8.54 wurde ich als erstes von vier Kindern des Elektroingenieurs Alois Dahlen und seiner Frau Elisabeth Dahlen, geb. Leibold, in Tönisheide bei Neviges, Kreis Mettmann geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Michael-Poeschke-Schule in Erlangen und wechselte dann auf das Ohm-Gymnasium der Stadt über, wo ich 1973 die Reifeprüfung ablegte.

1973 und 1974 diente ich bei der Bundeswehr und beim Deutschen Roten Kreuz als Zivildienstleistender.

Mein Medizinstudium begann ich nach einjähriger Wartezeit 1975 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. 1977 absolvierte ich das Physikum, 1978 die Erste Ärztliche Prüfung, 1980 die Zweite Ärztliche Prüfung und 1981 die Dritte Ärztliche Prüfung.

Erlangen, im Dezember 1981

Christian Dahlen

